

重層扁平上皮細胞シートの細胞採取組織の評価法の確立  
およびモデル系を用いた接着後の挙動解析

Establishment of an evaluation method for epithelial tissue  
as cell source for stratified squamous epithelial cell sheets  
and examination of cellular events after cell sheet grafting  
by using *in vitro* model

2017 年 3 月

葛西 善行

Yoshiyuki KASAI

重層扁平上皮細胞シートの細胞採取組織の評価法の確立  
およびモデル系を用いた接着後の挙動解析

Establishment of an evaluation method for epithelial tissue  
as cell source for stratified squamous epithelial cell sheets  
and examination of cellular events after cell sheet grafting  
by using *in vitro* model

2017 年 3 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科  
生命医科学専攻 生命機能材料科学研究

葛西 善行

Yoshiyuki KASAI



目次	
略語一覧	1
第一章 研究の背景と目的	3
1.1 研究背景	3
1.1.1 再生医療と研究動機	3
1.1.2 組織工学	4
1.1.3 重層扁平上皮組織	5
1.1.4 上皮間葉移行 (EMT)	7
1.1.5 上皮細胞の培養	9
1.1.6 温度応答性培養皿を用いた細胞シートの作製	11
1.1.7 細胞シートによる再生医療	12
1.2 細胞シートを用いた食道再生プロジェクトにおける課題と本研究の目的	13
1.2.1 ヒト食道組織と食道癌治療	13
1.2.2 口腔粘膜上皮細胞シートを用いた食道癌内視鏡的切除後の狭窄予防 ならびに創傷治癒促進	14
1.2.3 本研究の目的と概要	15
第一章 参考文献	18
第二章 上皮細胞シートの細胞ソース評価のためのブラシバイオプシーウエス タンブロッティング手法の構築	28
2.1 諸言	28
2.1.1 安全な治療を目的とした細胞シートの品質管理	28
2.1.2 患者口腔粘膜の性状評価の現状	29
2.1.3 ケラチンフィラメント	29
2.1.4 口腔前癌病変である白板症のケラチン発現パターン	31
2.1.5 ブラシバイオプシー	32
2.2 材料と方法	34
2.2.1 材料	34
2.2.1.1 実験サンプル	34
2.2.1.2 試薬	34
2.2.1.3 使用器具・機器	35
2.2.1.4 第二章使用抗体	36
2.2.2 実験方法	37
2.2.2.1 ブラシバイオプシー法によるサンプリング	37
2.2.2.2 癌細胞の培養	38

2.2.2.3 SDS-PAGE .....	39
2.2.2.4 ウェスタンブロッティング .....	39
2.2.2.5 口腔組織切片の作製 .....	40
2.2.2.6 免疫組織化学的染色 .....	40
2.3 実験結果 .....	42
2.3.1 回収した細胞の評価 .....	42
2.3.2 ウェスタンブロッティングおよび免疫組織学的手法による口腔上皮 評価 .....	43
2.3.3 口腔扁平上皮細胞と本手法の比較実験 .....	52
2.4 考察 .....	55
2.4.1 ブラシバイオプシーとウェスタンブロッティングを組み合わせる有 用性 .....	55
2.4.2 非角化重層扁平粘膜上皮細胞マーカーの検出の有効性 .....	55
2.4.3 角化重層扁平粘膜上皮細胞マーカーの検出の有用性 .....	56
2.4.4 重層扁平粘膜上皮の基底層細胞マーカーの検出の有用性 .....	57
2.4.5 口腔癌検出手法確立への期待 .....	59
2.4.6 第二章まとめ .....	62
第二章 参考文献 .....	63
第三章 重層扁平上皮細胞シート接着後の創傷治癒機構解析 .....	66
3.1 諸言 .....	66
3.1.1 本研究の意義 .....	66
3.1.2 上皮細胞の動的挙動に関する既存研究 .....	67
3.1.3 <i>In vitro</i> モデル系を用いた接着後の上皮細胞シートの挙動解析 .....	67
3.2 材料と方法 .....	69
3.2.1 材料 .....	69
3.2.1.1 実験サンプル .....	69
3.2.1.2 試薬 .....	69
3.2.1.3 使用器具・機器 .....	70
3.2.1.4 第三章で使用した抗体一覧 .....	71
3.2.2 試薬の準備（調製）と手技・方法 .....	72
3.2.2.1 KCM の調製 .....	72
3.2.2.2 培養基材の作製 .....	72
3.2.2.3 阻害剤 .....	72
3.2.2.4 NHEK 細胞シートの作製と培養 .....	73
3.2.2.5 NHEK 細胞シートの接着挙動アッセイ .....	73

3.2.2.6 細胞シートのパラフィン包埋ブロックおよびパラフィン切片作製.....	75
3.2.2.7 IHC Profiler による免疫染色結果の定量化.....	75
3.2.2.8 NHEK 細胞シート接着による核の角度の測定.....	76
3.2.2.9 NHEK 細胞シート接着後の増殖測定.....	76
3.2.2.10 遺伝子発現解析.....	76
3.2.2.11 粒子イメージ流速計測法 (Particle image velocimetry, PIV) による NHEK 細胞シート遊走挙動の定量解析.....	76
3.3 実験結果.....	78
3.3.1 上皮細胞シートのタンパク質発現パターン解析.....	78
3.3.2 NHEK 細胞シート接着アッセイ.....	81
3.3.3 コラーゲンゲルへの接着後の NHEK 細胞シートのタンパク質発現パターンの変化.....	84
3.3.4 NHEK 細胞シート接着後の遊走挙動.....	87
3.3.5 NHEK 細胞シートの集団的遊走パターン.....	92
3.3.6 ゲル内包埋細胞による NHEK 細胞シートの遊走能の変化.....	97
3.3.7 mRNA 発現解析と阻害剤添加実験.....	104
3.3.8 上皮細胞シートに関するその他の知見.....	107
3.4 考察.....	110
3.4.1 I 型コラーゲンゲルを用いた細胞シート接着の <i>in vitro</i> モデル実験.....	110
3.4.2 接着前の遊離の NHEK 細胞シートの性状.....	110
3.4.3 重層扁平上皮細胞シート接着後の初期挙動.....	112
3.4.4 基底層における Partial EMT.....	113
3.4.5 細胞シートの遊走挙動.....	115
3.4.6 第三章まとめ.....	117
第三章 参考文献.....	118
第四章 本研究の総括および今後の課題.....	123
4.1 第一章の総括.....	123
4.2 第二章の総括および今後の課題.....	123
4.2.1 第二章の総括.....	123
4.2.2 今後の課題①：マーカータンパク質のさらなる検討.....	124
4.2.3 今後の課題②：口腔病変患者の組織を用いた臨床研究.....	124
4.3 第三章の総括および今後の課題.....	124
4.3.1 第三章の総括.....	124
4.3.2 今後の課題①：本 <i>in vitro</i> モデルの細胞シート品質評価への応用.....	125

4.3.3 今後の課題②：細胞シートの Partial EMT 機構の詳細な解析.....	125
4.3.4 今後の課題③：細胞シートの集団的遊走機構の更なる解析 .....	126
4.3.5 今後の課題④：共培養系の詳細な解析.....	127
4.4 おわりに.....	128
第四章 参考文献.....	129
謝辞.....	130

## 略語一覧

- ・ cAMP : 環状アデノシン一リン酸 (Cyclic adenosine monophosphate)
- ・ AoSMC : ヒト大動脈平滑筋細胞 (Aortic smooth muscle cells)
- ・ BCA : ビシンコニン酸タンパク質定量法 (Bicinchoninic acid assay)
- ・ CPC : 細胞プロセッシングセンター (Cell processing center)
- ・ DAB : ジアミノベンジジン (3,3'-diaminobenzidine)
- ・ DMEM : ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium)
- ・ DMSO : ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide)
- ・ EDTA : エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid)
- ・ EGF : 上皮成長因子 (Epidermal growth factor)
- ・ EMT : 上皮間葉移行 (Epithelial to mesenchymal transition)
- ・ ESD : (食道癌) 内視鏡的切除術 (Endoscopic submucosal dissection)
- ・ FBS : ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum)
- ・ GAPDH : グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
- ・ GMP : 優良医薬品製造基準 (Good manufacturing practice)
- ・ GSK-3 : グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 (Glycogen synthase kinase 3)
- ・ HE : ヘマトキシリン・エオシン (Hematoxylin-eosin)
- ・ HP : 強陽性 (High positive)
- ・ HRP : 西洋わさびペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase)
- ・ HSMM : ヒト骨格筋筋芽細胞 (Human skeletal muscle myoblasts)
- ・ HUVEC : ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells)
- ・ K : ケラチン (Keratin)
- ・ KCM : 上皮細胞分化誘導培地 (Keratinocyte culture medium)
- ・ LP : 弱陽性 (Low positive)
- ・ N : 陰性 (Negative)
- ・ NHDF : 正常ヒト皮膚線維芽細胞 (Normal human dermal fibroblast)
- ・ NHEK : 正常ヒト表皮角化細胞 (Normal human epidermal keratinocytes)
- ・ P : 陽性 (Positive)
- ・ PBS : リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline)

- PCR : ポリメラーゼ連鎖反応法 (Polymerase chain reaction)
- PIPAAm : ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (poly(*N*-isopropylacrylamide))
- PIV : 粒子イメージ流速計測法 (Particle image velocimetry)
- PDGF : 血小板由来成長因子 (Platelet-derived growth factor)
- PDGF RKI : PDGF 受容体キナーゼ阻害剤 (PDGF receptor kinase inhibitor)
- PFA : パラホルムアルデヒド (Paraformaldehyde)
- P-MLC : リン酸化ミオシン (Thr18/Ser19) (Phospho-myosin light chain 2)
- PS : ペニシリンストレプトマイシン (Penicillin streptomycin)
- RIPA : 放射性免疫沈降法 (Radioimmunoprecipitation assay)
- SDS-PAGE : ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
- SOP : 標準作業手順書 (Standard operating procedure)
- TBS : トリス塩酸緩衝液 (Tris-buffered saline)
- TGF- $\beta$ 1 : トランスフォーミング増殖因子  $\beta$ 1 (Transforming growth factor beta1)
- TGF- $\beta$ 1 RKI : TGF- $\beta$ 1 受容体キナーゼ阻害剤 (TGF- $\beta$ 1 receptor kinase inhibitor)

# 第一章 研究の背景と目的

## 1.1 研究背景

### 1.1.1 再生医療と研究動機

医療機器や人工心臓の開発ならびに造血幹細胞や皮膚などの細胞・組織移植を始めとした医学の進歩により、これまでに多くの患者が救われてきた。この背景には分子生物学や組織学の研究によって生体組織の構成タンパク質や細胞の配置、病変の分子機構的特徴への理解が進んだことが関与しており、今後も難病を抱える患者のためには研究による進歩が求められている。近年著しい進歩がみられている医学研究として再生医療があげられる。再生医療とは失われた細胞・組織・器官を再生し、機能を回復させることを目標とした研究分野である。本博士研究では、この中の上皮組織の再生医療研究について取り組んだ。

上皮組織は、日本三大死因に挙げられる悪性新生物（癌）の病巣となる組織である。切除によって上皮癌は除去することができるが、上皮組織欠損による合併症が引き起こされる場合もあり、癌切除後の創傷床に上皮組織を移植する治療法が考えられてきた。共同研究先の東京女子医科大学先端生命医科学研究所は、患者由来の自家口腔粘膜から作製した上皮細胞シートを食道癌切除後の創傷床に移植することによって狭窄を予防する臨床研究を実施し、10名の癌患者の命を救ってきた。しかし、この成果も、治療法の確立に至ったわけではなく、動物モデル実験の知見を10人の患者に応用したに過ぎない。この方法を治療法として確立し多くの患者を救うとの目標を達成するためには、臨床試験数を増やすと共に、そこで見出された課題点を改善する基礎研究が必要である。

筆者は、続いて実施された「空輸した口腔粘膜上皮細胞シートを用いた臨床研究」に携わり、細胞シートを用いた医療の現在の課題点を抽出した。すなわち、今後、細胞シート移植治療を進める上では、安全性の保証と治癒の分子機構解明が大変重要であることを認識し、これらを基礎研究レベルで解決することを目的として本博士研究を実施した。

### 1.1.2 組織工学

多くの難病では最終的に組織や臓器不全を起こして死に至るため、ドナーから提供された臓器を移植する治療が有効である。しかし、ドナーの数は不足しており、全ての患者を救うことはできない。そこで、細胞、足場、生体シグナル因子という 3 つの要素を整えて、生体外で三次元の代替組織の作製を目指す「組織工学」という研究概念が 1993 年にランガー博士とバカンティ博士によって考案され[1]、移植治療への応用を目指して世界中で研究が盛んに行われている（図 1-1）[2]。日本でも、再生医療推進法が成立するなど、これら代替組織を利用した再生医療研究に注目が集まっている。

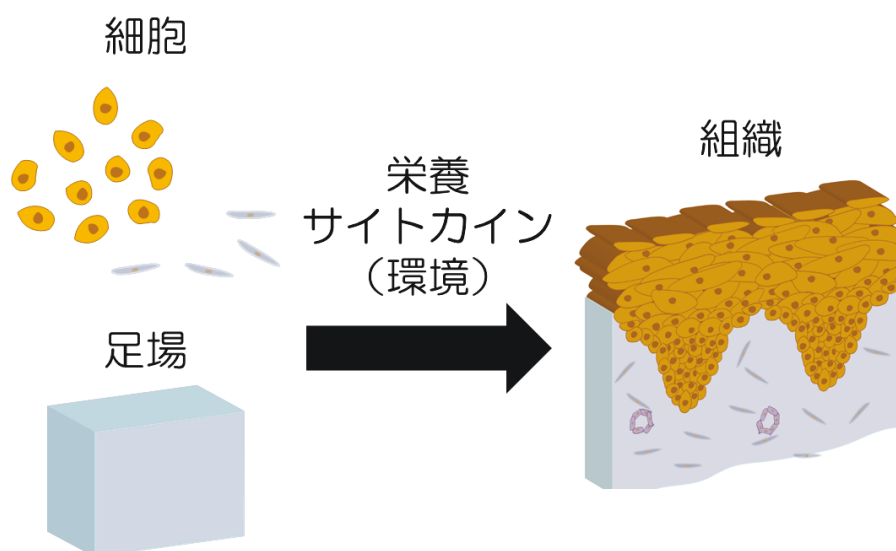


図 1-1. 組織工学の概略図。

iPS 細胞の開発によって山中博士がノーベル賞を受賞したことにより、iPS 細胞研究や体性幹細胞の研究が盛んに行われており、細胞ソースとして再生医療への応用が期待されている[3, 4]。しかし、細胞懸濁液を注入するだけの細胞移植では、細胞が移植部位から漏出するために生着率が低くなってしまいます。十分な有効性を得るためには大量の細胞を移植する必要があるが、治療結果も安定し得ないと考えられている[5]。したがって、細胞を高い生着率で移植可能な小型・大型組織の作製する研究ならびに、作製組織の移植法の研究も大変重要である。



### 1.1.3 重層扁平上皮組織

まず、本研究で対象とする重層扁平上皮組織および周囲に存在する結合組織について、基本的な役割と性質を述べる。

結合組織は主に Type I collagen からなる膠原繊維、線維芽細胞から成っており[6]、線維芽細胞には中間フィラメントである Vimentin が発現している[7]。

上皮組織はこの結合組織の上に存在し、多数の上皮細胞から成り立っており、体液の漏出ならびに体外からの異物侵入を遮るというバリア機能を持ち、生体内で重要な役割を担っている[8, 9]。このバリア機能は強い細胞間接着によるものであり、Cadherin が重要な役割を果たしている。この Cadherin は  $\text{Ca}^{2+}$  とともに細胞間接着に働くタンパク質であり[10]、Epithelial cadherin からこの名前が付けられている E-cadherin は角化層以外の全層に渡って発現し、 $\beta$ -catenin を介して上皮細胞内の骨格タンパク質であるケラチンフィラメントやアクチンフィラメントと結合する[11]。

ヒトの口腔粘膜上皮や表皮などは重層扁平上皮に分類され、数層に渡って扁平な上皮細胞が重なっている構造を示す。基底層の細胞は、結合組織から多くの増殖シグナルを基底層細胞が受け取って上層に重なるように増殖する。この重層扁平上皮は層毎に異なるタンパク質が発現し、異なる役割を果たしている(図 1-2) [12, 13]。

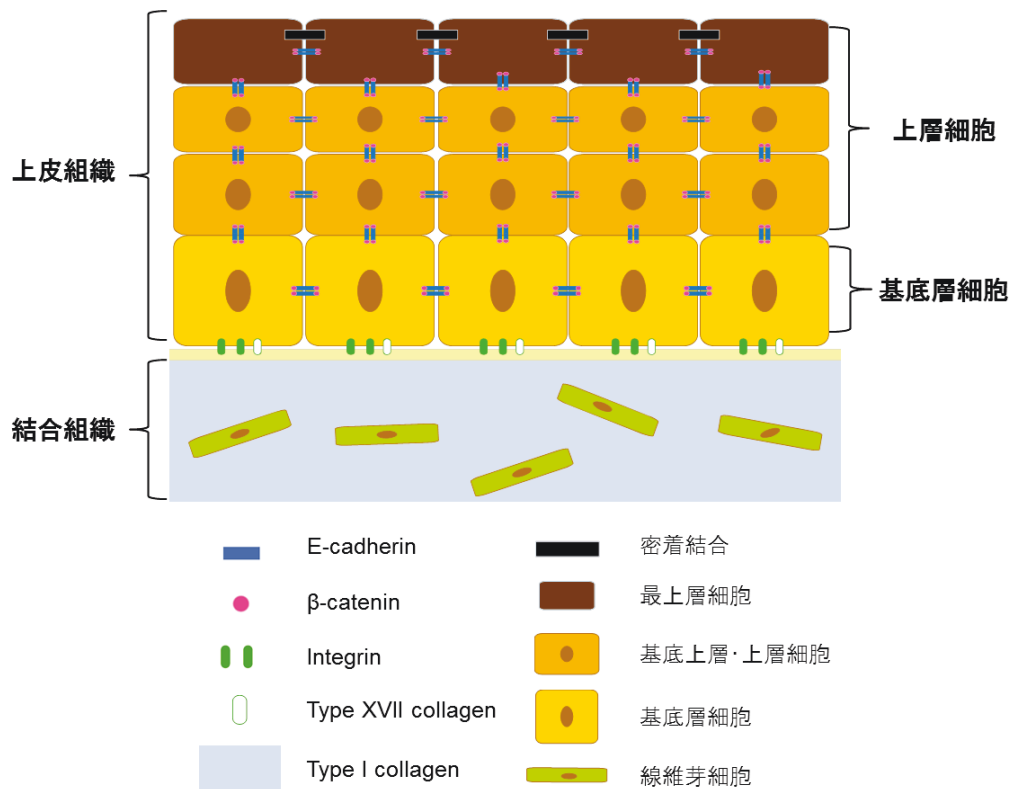


図 1-2. 重層扁平上皮の構造。重層扁平上皮は層毎に発現タンパク質が異なり、性質や機能も差異がある[13]。

上皮組織の基底層細胞にはインテグリンが発現している。元来は、細胞外マトリックスを認識するタンパク質として発見され[14]、*in vivo* では細胞-マトリックス結合を担っている[15]。特に Integrin  $\beta 4$  は、*in vivo* では Type XVII collagen とともに上皮細胞-マトリックス結合の特徴であるヘミデスモソーム結合を形成している[16]。このインテグリンは結合組織からの多くのシグナルを受け取る受容体として機能し、これにより、増殖マーカーである Ki67 や、上皮幹細胞あるいは前駆細胞のマーカーである p63 が基底層の細胞に発現していると考えられている[17, 18]。

基底層の細胞は上層に向かって増殖し、上層に移行するにつれて分化が進行する。終末分化に近づくとき最も分子量の大きい中間径フィラメントである Keratin 1 (K1) が発現し、Filaggrin により束ねられて細胞の機械的強度が高くなる[19, 20]。さらに、分化した上層の上皮細胞は密着結合も形成し、高いバリア機能を実現するために重要な役割を果たしている。

上皮組織は外界からの因子や内因性の増殖シグナルなどによって、最も癌化しやすいとされている。上皮癌を外科的に切除する医療機器の技術は著しく発展してきている。一方で、切除後に再びバリア機能などを回復させるため、上皮組織の再生技術は十分ではなく、開発が強く求められている。

#### 1.1.4 上皮間葉移行 (EMT)

重層扁平上皮組織は筋肉のような動的挙動はほとんど示さないが、上皮組織の創傷治癒時などには傷の周辺の上皮細胞が遊走して傷を修復する(図 1-3) [21]。

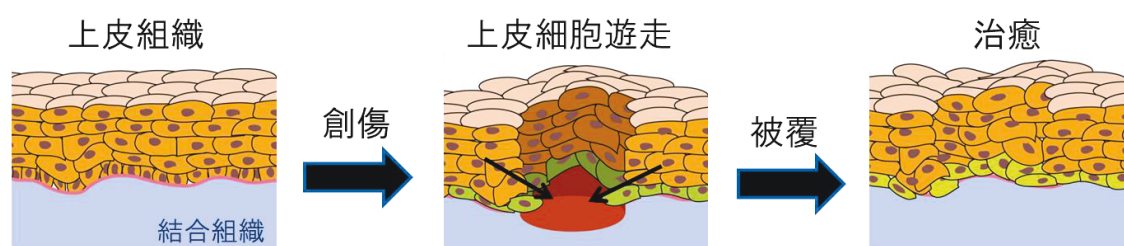


図 1-3. 創傷治癒過程の概略図。創傷があると上皮細胞が創傷床上を遊走し、これを被覆して修復する。

この上皮組織の遊走能獲得には、上皮間葉移行 (Epithelial to mesenchymal transition, EMT) と呼ばれる細胞挙動が重要である。この挙動は、上皮細胞/組織に特徴的に発現する E-cadherin や ZO-1 などが減少し、間葉系マーカーである Vimentin や N-cadherin などの発現が増加して上皮の強固な細胞間接着が低下する。さらに、インテグリンを用いて創傷床上に新たに接着場をつくり、リン酸化ミオシン (Phospho-myosin light chain 2, P-MLC) がアクチンを引き寄せたり、張力をかけたりすることで細胞が遊走し、傷を覆っていく。このように、上皮細胞が動的な機能を得るための重要な分子機構である (図 1-4) [22-24]。

この EMT は、1980 年代初期に Hay が EMT を提唱し[25]、その後、2007 年と 2008 年の二度の学術会議での議論を経て、EMT は大きく I 型、II 型、III 型の 3 つに分類された[21]。I 型 EMT は、発生の際の一連の EMT とされる。受精卵着床後、EMT を起こした細胞は、子宮内膜へ浸潤し、胎盤ならびに臍帯を形成する。さらに原外胚葉を形成し、原腸陥入することにも I 型 EMT に分類される。

II 型 EMT は前述の創傷治癒時に起こる EMT であり、III 型 EMT は癌細胞の浸潤時に起こる EMT である。

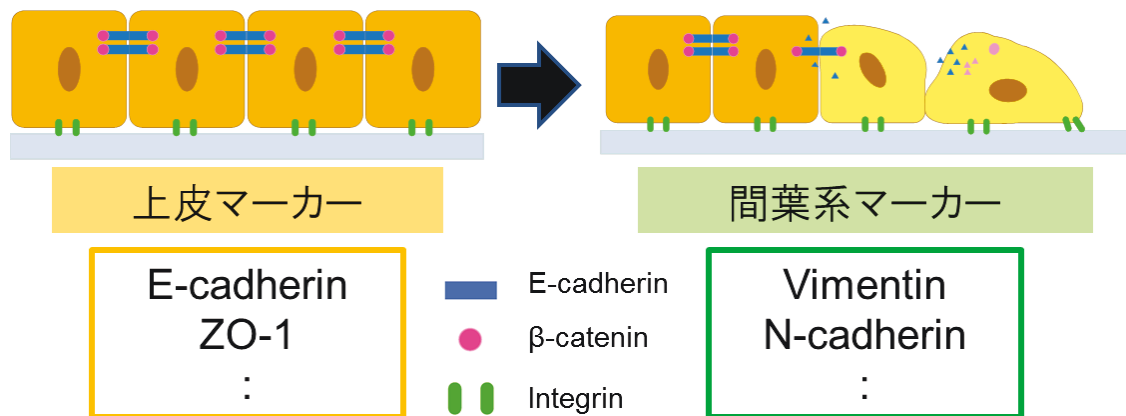


図 1-4. 上皮間葉系移行 (EMT) の模式図。EMT に伴う細胞間接着の変化と、発現が変化する上皮系マーカー分子 (オレンジ枠) 及び間葉系マーカー分子 (緑枠) の代表例[21]。

さらに EMT は、癌細胞などを用いての遺伝子レベルでの研究が進められてきた[26]。EMT の経路としてはトランスフォーミング増殖因子  $\beta$  (Transforming growth factor, TGF- $\beta$ ) 経路、JAK-STAT 経路、血小板由来成長因子 (Platelet-derived growth factor, PDGF) 経路、Notch 経路、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路といった多くのジャクスタクライン、パラクラインシグナル伝達が報告されている[27]。例えば Wnt/ $\beta$ -catenin 経路では、Wnt シグナルがない場合には  $\beta$ -catenin はグリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3, GSK-3 $\beta$ ) などの複合体によるリン酸化を受けて分解されているか、E-cadherin と複合体を形成して細胞間接着に働く。Wnt シグナルが入ると、Dishevelled (Dvl) を介したリン酸化の抑制により  $\beta$ -catenin は安定化され、核内へ移行して転写因子として働く (図 1-5)。この経路を阻害する薬剤として Imatinib が知られる。Imatinib は  $\beta$ -catenin の 654 番目のチロシンのリン酸化キナーゼ (TKs) を阻害し、E-cadherin と  $\beta$ -catenin の複合体形成を促進する[28, 29]。一方で、SB216763 は GSK-3 による  $\beta$ -catenin のリン酸化を阻害することによって  $\beta$ -catenin を安定化する。核内移行した  $\beta$ -catenin は Vimentin や N-cadherin を始めとした EMT 遺伝子の転写因子として働き、mRNA レベルで EMT を促進する[30]。

これらの遺伝子発現レベルでの EMT をはじめ、すべての EMT の第一段階は上皮組織での細胞間接着の崩壊であり、この細胞間接着を失った上皮細胞では

インテグリンが活性化し、アクチンの再構築が起こり、ラメリポディア、フィロポディア、インバードポディアなどが形成されて細胞の遊走や浸潤が起こるとされている[31]。

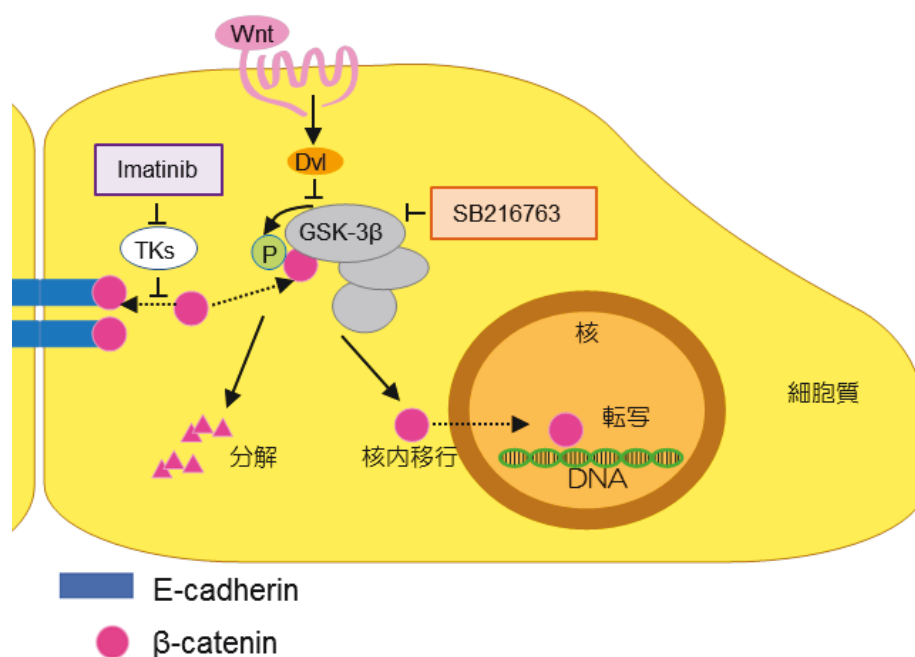


図 1-5. EMT シグナル伝達経路の一つである Wnt/β-catenin 経路の模式図。

以上の知見は単一細胞ならびに生体の上皮組織を対象として蓄積されてきたものである。一方で、本研究で対象とした細胞シートのような細胞群についての研究はほとんどなされていない。

### 1.1.5 上皮細胞の培養

上皮細胞の培養系が確立される以前は、表皮細胞ならびに口腔粘膜上皮細胞がエキスプラントあるいは器官培養によって培養できるのがせいぜいであった[32, 33]。この方法では試料に結合組織が多く含まれており、[32]線維芽細胞の混入を防ぐため、トリプシンを用いて上皮細胞を結合組織から分けることが試みられた[34, 35]。当初はトリプシンを 4-5 時間反応させていたが[33, 36]、トリプシンは細胞膜タンパク質を分解して生存率も下げるため、さらに改良が加えられた[37-41]。ディスパーゼは *Paenibacillus* sp. (旧名 : *Bacillus polymyxa*) 由来の

タンパク質分解酵素であり[42, 43]、基底膜や細胞外マトリックスタンパク質を分解する[44]。このディスパーゼを用いて結合組織から上皮層を剥離した後、トリプシンとエチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) の混合溶液 (トリプシン EDTA) を反応させると 20 分で上皮細胞を単離することができるようになった[45]。このようにして、上皮細胞の単離技術が確立されてきた。

上皮細胞の単離に加えて、培養液にも改良が加えられてきた。現在もダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) などの培地に名を残している Eagle が中心となって、抗生物質のペニシリンとストレプトマイシンに加えて、細胞増殖に必要な栄養素である 6 種類の塩基[46]、13 種類のアミノ酸とグルコース[47, 48]、8 種類のビタミン[49, 50]、などを添加した培養液が開発された。

この培養液に牛胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS) を加え、さらに上皮細胞に栄養を与えるフィーダー細胞として放射線で増殖を止めたマウス線維芽細胞由来の 3T3 細胞を用いて共培養することにより、テラトーマ細胞ならびにヒト表皮細胞のコロニーを形成させることに成功した[51, 52]。このコロニー内の細胞には中間フィラメント (ケラチンフィラメント) やデスモソーム結合などが存在することが見出され、一度トリプシンで単離された上皮細胞でも培養することにより再び上皮組織の様に細胞間接着などが形成されることが示された。このように、上皮細胞の形質を維持しつつ増殖させ得る培養条件が開発されてきた[52]。

上皮細胞の増殖因子を突き止めるため、ならびに培養条件改良を目的として、生体シグナル因子を添加する研究も進められた。1963 年に発見された上皮成長因子 (Epidermal growth factor, EGF) については[53]、コロニー形成数とコロニーの大きさで増殖能を明らかにするコロニーフォーミングアッセイにより最適濃度が決められた[54]。また、コレラトキシンを添加すると環状アデノシン一リン酸 (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 産生の抑制経路が負に制御され、結果として cAMP の産生が促進し、上皮細胞の増殖を促進することが見出された[55]。さらに、ヒドロコルチゾン[52]、インスリンとトランスフェリン[56]、トリヨードチロニン[57]、アデニンの添加や、Ham らによって開発された栄養混合培地 F-12 によって上皮細胞の増殖率が改善し[58]、これらの研究の成果であ



る上皮細胞培地により上皮細胞を効率的に細胞培養皿の底面全体を占めるコンフルエント状態まで増殖させることが可能になった[59]。

このコンフルエントまで増殖した上皮細胞を移植片として活用するために、グリーン博士らはトリプシン EDTA よりも細胞障害性の少ないディスパーゼを用いることによって、ヒト表皮由来の培養細胞をシート状に剥離回収することに成功した[60]。事項で述べる細胞シートの原型とも言えるこのヒト培養表皮グラフトを胸腺欠損マウス（免疫拒絶ができないマウス）に移植したところ、108日後でも残存が確認された[61]。これらの知見を踏まえて、培養表皮グラフトをヒトへ移植するヒトで臨床研究が行われるようになった。

1981 年、Ⅲ度熱傷の患者に対してこの培養表皮が世界で初めて移植された[62]。また、身体の 97%を超える範囲の三度熱傷の兄弟に対して、培養表皮を繰り返し移植することで、14 週間後には皮膚の再生に成功した。こうして従来法では助からなかった命が救われ、細胞移植治療の重要性と有効性が認識された[63]。

その後、この培養上皮グラフトは様々な生体上皮組織を代替する移植片として、潰瘍[64, 65]、先天性巨大母斑[66]、角膜[67-69]、尿道[70]、表皮[71, 72]、口腔内[72-75]への移植治療がなされてきた。

### 1.1.6 温度応答性培養皿を用いた細胞シートの作製

工学的に作製した材料を生体に積極的に応用していくバイオマテリアルにも注目が集まっている。筆者の共同研究先の東京女子医科大学先端生命医科学研究所では、1995 年に岡野博士らが温度応答性培養皿を開発した[76]。これは、32℃より高温下で疎水性、低温下で親水性を示す高分子であるポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (poly(*N*-isopropylacrylamide), PIPAAm) を細胞培養皿の底面に固定したものである。この培養皿を用いると、培養温度の 37℃で細胞が接着して増殖することができる。続いてコンフルエントまで増殖させた後に 20℃まで冷却することで、細胞同士の細胞間接着を保ったまま一枚の「細胞シート」として剥離回収することができる (図 1-6)。

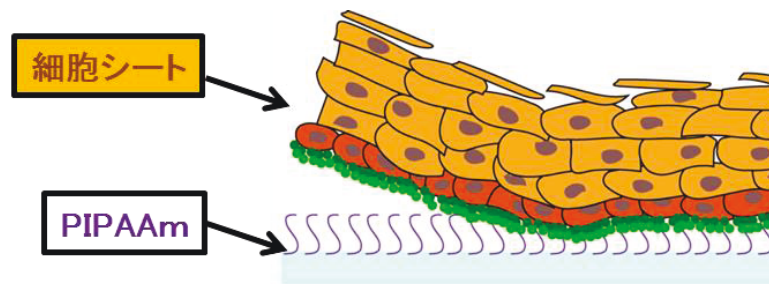


図 1-6. 温度応答性培養皿を用いた細胞シート作製。温度応答性高分子ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (poly(*N*-isopropylacrylamide), PIPAAm) を固定した培養皿を用いることで、温度変化によって細胞の接着と剥離を制御することができる。タンパク質分解酵素を使用しないため回収した細胞シートに接着タンパク質が温存され、縫合せずに移植が可能である。

これまでは、接着細胞を回収するためにはトリプシンやディスパーゼなどのタンパク質分解酵素で細胞-培養基材間に備わった接着タンパク質を分解することで細胞を剥離していたが、細胞間の結合に関わるタンパク質も部分的に分解してしまっていた[77]。温度応答性培養皿を用いる回収方法は細胞障害性が低く細胞が培養の間に分泌した接着タンパク質を温存できるため、移植部位に縫合せずに生着させられるため細胞の移植治療を飛躍的に進展させた[78]。

東京女子医科大学では、場所を隔ててインサート器材にも温度応答性処理を施し(温度応答性インサート)、これを用いることによってフィーダー細胞の 3T3 を用いずにヒト口腔粘膜上皮細胞シートを作製することにも成功した[45]。このヒト口腔粘膜上皮細胞シートを用いて、優良医薬品製造基準 (Good manufacturing practice, GMP) に準拠しながら食道再生の臨床研究が進められている。本博士研究では GMP 基準でない研究用の試薬ながらも、温度応答性インサートを用いて 3T3 非存在下で上皮細胞シートを作製し、これを用いて基礎研究を進めた(第三章)。

### 1.1.7 細胞シートによる再生医療

温度応答性培養皿を用いれば多種の細胞から細胞シートを作製できる。このため、心臓[5]、角膜[79]、食道[80]、歯根膜[81]、軟骨[82]、中耳[83]、肺[84]などといった体内のあらゆる組織の細胞から細胞シートを作製し、代替組織の構



築を目指して研究が進められている。これらの研究分野は、組織工学にちなんで「細胞シート工学」として認知されるようになっていく。

細胞シートの移植による治療は、すでにヒト臨床研究も始まっている。例えば角膜再生プロジェクトでは、角膜上皮幹細胞疲弊症によって黒目の部分に白目の部分の結膜上皮細胞が遊走してしまう患者に対し、自家口腔粘膜上皮細胞シートを移植する治療が行われている。数年後でも角膜の透明性や視力が維持されているとの成果が得られている。これは細胞シートに含まれる幹細胞が維持されるためと考えられており、根治の観点からも極めて研究価値が高い[79]。また、筆者が携わった食道の再生医療についても次節に記載する。

## **1.2 細胞シートを用いた食道再生プロジェクトにおける課題と本研究の目的**

### **1.2.1 ヒト食道組織と食道癌治療**

食道は口と胃の間に位置する器官で、長さは 25 cm、太さは 2-3 cm あり、上部から頸部食道、胸部食道、腹部食道に分けられる。日本では食道癌によって 2009 年には 11713 人が死亡しており、悪性新生物死亡者数全体の約 3.4%を占めている[85]。このうち男性が 9908 人、女性が 1805 人であり、アルコール多飲やたばこによる発癌リスクの上昇を示すものと考えられる[86-88]。食道癌には腺癌、未分化癌などがあるが、90%以上は扁平上皮癌である[89]。同時性多発癌、異時性多発癌、ならびに多臓器癌合併が多く、特にアルコール多飲やたばこがリスクファクターである胃癌、咽頭癌、口腔癌が多い。この食道癌を治療するために以前は開腹手術を行っていたが、術死のリスクがあるため、広範囲な早期扁平上皮癌に対して内視鏡的粘膜下層剥離術 (Endoscopic submucosal dissection, ESD) が考案された[90]。ESD は口腔から内視鏡を挿入し、先端に取り付けたナイフで粘膜下層から上皮癌を剥離する術式である。開腹手術に比べて傷が小さいため、現在広く用いられている。しかし、3/4 周以上または長軸方向に直径 40 mm 以上にわたる食道癌を切除すると合併症として狭窄が起こってしまう問題点がある[91]。狭窄とは食道が狭くなる合併症であり、食べ物が通過せず患者の

クオリティーオブライフが著しく低下する。狭窄を治療する手段として、内視鏡で小型の風船を挿入して膨らませるバルーン拡張術があるが、数十回にわたって行わなければならない、コストがかかりさらに侵襲性が高いため患者への負担が大きい[92]。

そこで、東京女子医科大学では、大木博士らによって自家口腔粘膜上皮細胞で作製した細胞シートを ESD 後の創傷床へ移植する治療法が開発された。モデル実験動物を用いた研究により、細胞シートを移植することによって傷が早期に治ることが示され、狭窄の予防にも効果があると出来得ると考えられたため、2006 年よりヒト臨床研究が 10 例実施された。この結果、ヒトに移植しても副作用はなく、狭窄予防に効果がある結果も得られた[93]。

さらに、細胞シートが持つ狭窄予防効果を積極的に検証するために、確実に狭窄が起こる程、広範囲にわたって ESD を施した「ブタ食道狭窄モデル」を作製し、この ESD 後の創傷床に上皮細胞シートを移植する実験が行われた。その結果、細胞シート移植が狭窄の予防に顕著な効果を発揮することが示された[94]。このことからヒトの食道粘膜癌が広範囲の場合でも、上皮細胞シートを用いた治療が有効であるとの期待が高まった。

### 1.2.2 口腔粘膜上皮細胞シートを用いた食道癌内視鏡的切除後の狭窄予防ならびに創傷治癒促進

前節で述べた動物実験の結果を踏まえて、広範囲にわたって食道粘膜癌がある患者を対象として、ESD 後の創傷床へ自家の口腔粘膜上皮細胞から作製した臨床研究が検討された。この際、細胞シートを作製する施設である細胞プロセッシングセンター（Cell processing center, CPC）では徹底した衛生と空調管理によって無菌性が担保されているが、多くの維持費や労働力が必要であり、全ての病院に設けるのは非現実的である。そこで中核となる CPC 施設から各病院へ細胞シートを輸送するシステムを確立することも重要となる。

この 2 つの課題を解決するための、東京女子医科大学と長崎大学医学部の共同研究として、東京から長崎へ輸送した細胞シートの安全性と広範囲 ESD 後の細胞シート移植の有効性の評価を目的に「空輸した口腔粘膜上皮細胞シートを用いた臨床研究」と題した臨床試験が 2013 年より 10 症例行われ、筆者もこのプロジェクトに従事した。

このプロジェクトではまず、細胞ソースである患者由来口腔粘膜組織を培養液と抗生剤からなる輸送液内に入れ、4℃を保ったまま長崎大学から東京女子医科大学のCPC内の安全キャビネットに持ち込み、上皮細胞を単離して温度応答性インサート上でこの細胞を培養した[95]。15日間の培養後、温度を37℃に保ちながら、東京女子医科大学のCPCから飛行機と電車を用い、1200 kmを5-7時間かけて長崎大学病院へ輸送した。この輸送を経ても細胞シートの基本的な性質が維持されていることを前臨床試験で確認した[96]。16日目に手術現場に持ち込んだ細胞シートは、破損がないようにかつ術傷へ接着できる基底面がわかるように培養器材から回収し、内視鏡医が術傷へ移植した。この臨床研究は10症例行われ、全ての患者で移植手術が成功した[97]。

しかし、品質管理試験により、*Candida albicans* のコンタミネーションが確認された症例があった。それまでの動物実験や、女子医科大学のみで実施した臨床研究では *Candida albicans* がコンタミネーションした例はなかったが、患者の口腔の性状は個人差があるため、今後も起こり得る問題点と考えられた。アムホテリシン B は、1.0 µg/mL 以上の濃度で *Candida* などの菌種の増殖を完全に阻害する抗生物質として知られるが、哺乳類細胞の増殖も抑制してしまうため、本プロジェクトにおける輸送液ならびに培養液には 0.27 µg/mL で添加していた。そこで、輸送液のみアムホテリシン B の濃度を 1.0 µg/mL に調製したところ、同一患者で *Candida albicans* のコンタミネーションなしで細胞シートを作製することに成功した[96]。

このように、臨床研究を行うと動物実験では想定し得なかった問題点が浮上し得る。今後、細胞シート移植を有効な治療法として確立し数万人や数億人の患者を救うためには、明確なサイエンスに裏付けられた技術開発が重要である。

### 1.2.3 本研究の目的と概要

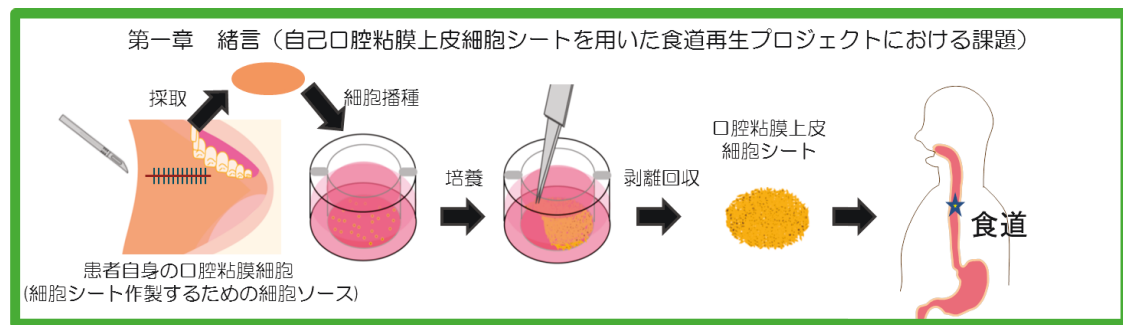
前述した細胞シート移植の安全な治療法としての確立には、品質が安定した口腔粘膜上皮細胞シートの作製が求められている。培養方法が確立された現在、最も不安定な要素は患者の口腔粘膜の性状であると考えられる。特に、臨床研究で対象とした食道癌患者の口腔粘膜組織は癌を併発しているあるいは前癌病変となっていることが少なくなく、正常な細胞で細胞シートを作製する上で、

細胞ソースである患者一人一人の口腔粘膜組織の性状を正確に把握することが重要である。

現在、口腔粘膜組織の性状は目視で診断されているため、医師の主観に左右されやすい。客観的な診断法を確立することで、安全に移植し得る細胞シートの作製効率がさらに向上すると考えられる。しかし、病理診断で正確に組織を評価するには組織を採取する必要がある、この組織採取は患者への負担が大きい。そこで、低侵襲的に口腔粘膜上皮細胞を評価する解析手法の確立を研究目的とした。

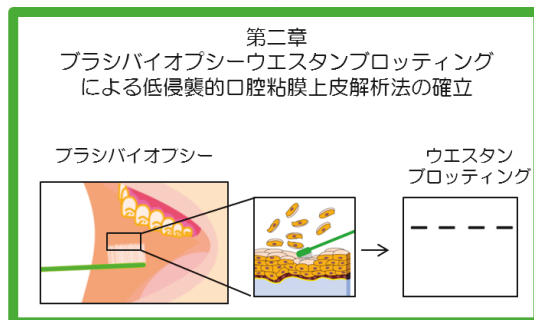
具体的には、「ブラシバイオプシーウエスタンブロッティング法を確立し、細胞ソースの事前解析による細胞シート治療の安全性の向上を目的とした研究」を実施した（第二章）。

また、細胞シート移植の有効性を明確にするには、移植後の細胞シートの挙動を経時的にかつ詳細に解析する必要がある。しかし、治癒過程の組織を採取して解析することは困難であるため研究がほとんど進められていない。そこで、「シンプルな *in vitro* モデル実験系を確立し、接着後の重層扁平上皮細胞シートの経時的变化ならびに挙動を詳細に解析する研究」を実施した（第三章）。これらを踏まえた本研究の全体構成を図 1-7 に示す。



課題1  
患者によっては口腔粘膜細胞が病気に罹患している。

安全な治療法確立に向けた  
細胞性状の簡便な解析法の確立



課題2  
細胞シートは移植後に治療効果を発揮するが、そのメカニズムは未解明な部分が多い。

有効性の保証と治療効果促進に向けた  
治癒機構の解明

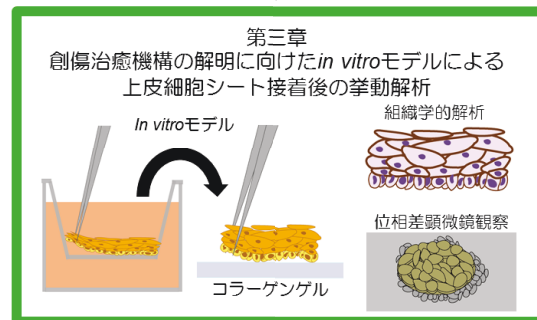


図 1-7. 本研究の全体構成。第二章には、安全な治療法に向けた口腔粘膜細胞の簡便な性状解析方法の確立について記載する。第三章には、細胞シート移植の治癒機構の解明に向けた *in vitro* モデル系を用いた接着後の細胞シートの挙動解析の研究を記載する。【[98](#)】より改変・転載】

## **第一章 参考文献**

1. Khademhosseini, A, Langer, R, Borenstein, J and Vacanti, JP (2006) Microscale technologies for tissue engineering and biology, *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2480-7.
2. Langer, R, Vacanti, JP (1993) Tissue engineering, *Science* **260**, 920-6.
3. Takahashi, K, Yamanaka, S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* **126**, 663-76.
4. Takahashi, K, Tanabe, K, Ohnuki, M, Narita, M, Ichisaka, T, Tomoda, K and Yamanaka, S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell* **131**, 861-72.
5. Sawa, Y, Miyagawa, S, Sakaguchi, T, Fujita, T, Matsuyama, A, Saito, A, Shimizu, T and Okano, T (2012) Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case, *Surg Today* **42**, 181-4.
6. Di Lullo, GA, Sweeney, SM, Korkko, J, Ala-Kokko, L and San Antonio, JD (2002) Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen, *J Biol Chem* **277**, 4223-31.
7. Osborn, M, Debus, E and Weber, K (1984) Monoclonal antibodies specific for vimentin, *Eur J Cell Biol* **34**, 137-43.
8. Steinert, PM (2000) The complexity and redundancy of epithelial barrier function, *J Cell Biol* **151**, F5-8.
9. Powell, DW (1981) Barrier function of epithelia, *Am J Physiol* **241**, G275-88.
10. Takeichi, M (1977) Functional correlation between cell adhesive properties and some cell-surface proteins, *J Cell Biol* **75**, 464-74.
11. Tunggal, JA, Helfrich, I, Schmitz, A, Schwarz, H, Gunzel, D, Fromm, M, Kemler, R, Krieg, T and Niessen, CM (2005) E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions, *Embo Journal* **24**, 1146-56.

12. Rodriguez-Boulan, E, Macara, IG (2014) Organization and execution of the epithelial polarity programme, *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 225-42.
13. Presland, RB, Dale, BA (2000) Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease, *Crit Rev Oral Biol Med* **11**, 383-408.
14. Pytela, R, Pierschbacher, MD and Ruoslahti, E (1985) Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor, *Cell* **40**, 191-8.
15. Barczyk, M, Carracedo, S and Gullberg, D (2010) Integrins, *Cell Tissue Res* **339**, 269-80.
16. Litjens, SH, de Pereda, JM and Sonnenberg, A (2006) Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes, *Trends Cell Biol* **16**, 376-83.
17. Camidge, DR, Pemberton, MN, Growcott, JW, Johnstone, D, Laud, PJ, Foster, JR, Randall, KJ and Hughes, AM (2005) Assessing proliferation, cell-cycle arrest and apoptotic end points in human buccal punch biopsies for use as pharmacodynamic biomarkers in drug development, *Br J Cancer* **93**, 208-15.
18. Pellegrini, G, Dellambra, E, Golisano, O, Martinelli, E, Fantozzi, I, Bondanza, S, Ponzin, D, McKeon, F and De Luca, M (2001) p63 identifies keratinocyte stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3156-61.
19. Moll, R, Divo, M and Langbein, L (2008) The human keratins: biology and pathology, *Histochem Cell Biol* **129**, 705-33.
20. Manabe, M, Sanchez, M, Sun, TT and Dale, BA (1991) Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris, *Differentiation* **48**, 43-50.
21. Kalluri, R, Weinberg, RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J Clin Invest* **119**, 1420-8.
22. Shaw, TJ, Martin, P (2009) Wound repair at a glance, *J Cell Sci* **122**, 3209-13.
23. Friedl, P, Gilmour, D (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer, *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 445-57.

24. Martin, P (1997) Wound healing-aiming for perfect skin regeneration, *Science* **276**, 75-81.
25. Hay, ED (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation, *Acta Anat (Basel)* **154**, 8-20.
26. Savagner, P (2010) The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon, *Ann Oncol* **21 Suppl 7**, vii89-92.
27. Pattabiraman, DR, Weinberg, RA (2014) Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose?, *Nat Rev Drug Discov* **13**, 497-512.
28. Roura, S, Miravet, S, Piedra, J, Garcia de Herreros, A and Dunach, M (1999) Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation, *J Biol Chem* **274**, 36734-40.
29. Zhou, L, An, N, Haydon, RC, Zhou, Q, Cheng, H, Peng, Y, Jiang, W, Luu, HH, Vanichakarn, P, Szatkowski, JP, Park, JY, Breyer, B and He, T-C (2003) Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the  $\beta$ -catenin signaling activity, *Cancer Letters* **193**, 161-70.
30. Coghlan, MP, Culbert, AA, Cross, DAE, Corcoran, SL, Yates, JW, Pearce, NJ, Rausch, OL, Murphy, GJ, Carter, PS, Cox, LR, Mills, D, Brown, MJ, Haigh, D, Ward, RW, Smith, DG, Murray, KJ, Reith, AD and Holder, JC (2000) Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription, *Chem Biol* **7**, 793-803.
31. Lamouille, S, Xu, J and Derynck, R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 178-96.
32. Flaxman, BA, Lutzner, MA and Vanscott, EJ (1967) Cell maturation and tissue organization in epithelial outgrowths from skin and buccal mucosa in vitro, *J Invest Dermatol* **49**, 322-32.
33. Parkinson, EK, Yeudall, WA (2002) The Epidermis in *Culture of Epithelial Cells, Second Edition*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 65-94.
34. Yuspa, SH, Morgan, DL, Walker, RJ and Bates, RR (1970) The growth of fetal mouse skin in cell culture and transplantation to F1 mice, *J Invest Dermatol* **55**, 379-89.



35. Worst, PK, Valentine, EA and Fusenig, NE (1974) Formation of epidermis after reimplantation of pure primary epidermal cell cultures from perinatal mouse skin, *J Natl Cancer Inst* **53**, 1061-4.
36. Rheinwald, JG (1980) Serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes, *Methods Cell Biol* **21A**, 229-54.
37. Okano, T, Yamada, N, Sakai, H and Sakurai, Y (1993) A novel recovery-system for cultured-cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(*N*-Isopropylacrylamide), *J Biomed Mater Res A* **27**, 1243-51.
38. Revel, JP, Hoch, P and Ho, D (1974) Adhesion of culture cells to their substratum, *Experimental Cell Research* **84**, 207-18.
39. Waymouth, C (1974) To disaggregate or not to disaggregate injury and cell disaggregation, transient or permanent?, *In Vitro* **10**, 97-111.
40. Osunkoya, BO, Mottram, FC and Isoun, MJ (1969) Synthesis and fate of immunological surface receptors on cultured burkitt lymphoma cells, *Int J Cancer* **4**, 159-65.
41. Kuroda, Y, Kitada, M, Wakao, S, Nishikawa, K, Tanimura, Y, Makinoshima, H, Goda, M, Akashi, H, Inutsuka, A, Niwa, A, Shigemoto, T, Nabeshima, Y, Nakahata, T, Nabeshima, Y, Fujiyoshi, Y and Dezawa, M (2010) Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations, *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8639-43.
42. Matsumura, T, Nitta, K, Yoshikawa, M, Takaoka, T and Katsuta, H (1975) Action of bacterial neutral protease on the dispersion of mammalian cells in tissue culture, *Jpn J Exp Med* **45**, 383-92.
43. Matsumura, T, Yamanaka, T, Hashizume, S, Irie, Y and Nitta, K (1975) Tissue dispersion, cell harvest and fluid suspension culture by the use of bacterial neutral protease, *Jpn J Exp Med* **45**, 377-82.
44. Lim, LS, Riau, A, Poh, R, Tan, DT, Beuerman, RW and Mehta, JS (2009) Effect of dispase denudation on amniotic membrane, *Mol Vis* **15**, 1962-70.
45. Murakami, D, Yamato, M, Nishida, K, Ohki, T, Takagi, R, Yang, J, Namiki, H and Okano, T (2006) Fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cell sheets

using temperature-responsive culture inserts without feeder layer cells, *J Artif Organs* **9**, 185-91.

46. Earle, WR (1943) Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells, *J Natl Cancer Inst Monogr* **4**, 165-212.

47. Eagle, H (1955) The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain L) in tissue culture, *J Biol Chem* **214**, 839-52.

48. Eagle, H (1955) The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Stain HeLa) in tissue culture, *J Exp Med* **102**, 37-48.

49. Eagle, H (1955) The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure, *J Exp Med* **102**, 595-600.

50. Eagle, H (1955) Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture, *Science* **122**, 501-14.

51. Rheinwald, JG, Green, H (1975) Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma, *Cell* **6**, 317-30.

52. Rheinwald, JG, Green, H (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells, *Cell* **6**, 331-43.

53. Cohen, S, Elliott, GA (1963) The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse, *J Invest Dermatol* **40**, 1-5.

54. Rheinwald, JG, Green, H (1977) Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes, *Nature* **265**, 421-4.

55. Green, H (1978) Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view, *Cell* **15**, 801-11.

56. Tsao, MC, Walthall, BJ and Ham, RG (1982) Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium, *J Cell Physiol* **110**, 219-29.

57. Maciag, T, Nemore, RE, Weinstein, R and Gilchrest, BA (1981) An endocrine approach to the control of epidermal growth: serum-free cultivation of human keratinocytes, *Science* **211**, 1452-4.

58. Allenhoffmann, BL, Rheinwald, JG (1984) Polycyclic aromatic hydrocarbon mutagenesis of human epidermal-keratinocytes in culture, *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7802-6.
59. Green, H (2010) Therapy with Cultured Cells, *Therapy with Cultured Cells*, 1-88.
60. Green, H, Kehinde, O and Thomas, J (1979) Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting, *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5665-8.
61. Banks-Schlegel, S, Green, H (1980) Formation of epidermis by serially cultivated human epidermal cells transplanted as an epithelium to athymic mice, *Transplantation* **29**, 308-13.
62. Oconnor, NE, Mulliken, JB, Banksschlegel, S, Kehinde, O and Green, H (1981) Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal-cells, *Lancet* **1**, 75-8.
63. Gallico, GG, 3rd, O'Connor, NE, Compton, CC, Kehinde, O and Green, H (1984) Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium, *N Engl J Med* **311**, 448-51.
64. Romagnoli, G, De Luca, M, Faranda, F, Bandelloni, R, Franzi, AT, Cataliotti, F and Cancedda, R (1990) Treatment of posterior hypospadias by the autologous graft of cultured urethral epithelium, *N Engl J Med* **323**, 527-30.
65. Romagnoli, G, De Luca, M, Faranda, F, Franzi, AT and Cancedda, R (1993) One-step treatment of proximal hypospadias by the autologous graft of cultured urethral epithelium, *J Urol* **150**, 1204-7.
66. Gallico, GG, 3rd, O'Connor, NE, Compton, CC, Remensnyder, JP, Kehinde, O and Green, H (1989) Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi, *Plast Reconstr Surg* **84**, 1-9.
67. Nakamura, T, Inatomi, T, Sotozono, C, Amemiya, T, Kanamura, N and Kinoshita, S (2004) Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders, *Br J Ophthalmol* **88**, 1280-4.

68. Liu, J, Sheha, H, Fu, Y, Giegengack, M and Tseng, SC (2011) Oral mucosal graft with amniotic membrane transplantation for total limbal stem cell deficiency, *Am J Ophthalmol* **152**, 739-47 e1.
69. Burillon, C, Huot, L, Justin, V, Nataf, S, Chapuis, F, Decullier, E and Damour, O (2012) Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 1325-31.
70. Lauer, G, Schimming, R and Frankenschmidt, A (2001) Intraoral wound closure with tissue-engineered mucosa: new perspectives for urethra reconstruction with buccal mucosa grafts, *Plast Reconstr Surg* **107**, 25-33.
71. Ueda, M, Hata, K, Horie, K and Torii, S (1995) The potential of oral mucosal cells for cultured epithelium: a preliminary report, *Ann Plast Surg* **35**, 498-504.
72. Hata, K, Ueda, M (1996) Fabrication of cultured epithelium using oral mucosal cells and its clinical applications, *Human cell* **9**, 91-6.
73. Deluca, M, Albanese, E, Megna, M, Cancedda, R, Mangiante, PE, Cadoni, A and Franzi, AT (1990) Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with defects in the oral-mucosa retains properties of the original donor site, *Transplantation* **50**, 454-9.
74. Izumi, K, Feinberg, SE, Iida, A and Yoshizawa, M (2003) Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report, *Int J Oral Maxillofac Surg* **32**, 188-97.
75. Tsai, C-y, Ueda, M, Hata, K-i, Horie, K, Hibino, Y, Sugimura, Y, Toriyama, K and Torii, S (1997) Clinical results of cultured epithelial cell grafting in the oral and maxillofacial region, *J Craniomaxillofac Surg* **25**, 4-8.
76. Okano, T, Yamada, N, Okuhara, M, Sakai, H and Sakurai, Y (1995) Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces, *Biomaterials* **16**, 297-30.
77. Yamato, M, Utsumi, M, Kushida, A, Konno, C, Kikuchi, A and Okano, T (2001) Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without dispase by reducing temperature, *Tissue Eng* **7**, 473-80.

78. Kushida, A, Yamato, M, Konno, C, Kikuchi, A, Sakurai, Y and Okano, T (1999) Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces, *J Biomed Mater Res A* **45**, 355-62.
79. Nishida, K, Yamato, M, Hayashida, Y, Watanabe, K, Yamamoto, K, Adachi, E, Nagai, S, Kikuchi, A, Maeda, N, Watanabe, H, Okano, T and Tano, Y (2004) Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium, *N Engl J Med* **351**, 1187-96.
80. Ohki, T, Yamato, M, Murakami, D, Takagi, R, Yang, J, Namiki, H, Okano, T and Takasaki, K (2006) Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model, *Gut* **55**, 1704-10.
81. Iwata, T, Yamato, M, Tsuchioka, H, Takagi, R, Mukobata, S, Washio, K, Okano, T and Ishikawa, I (2009) Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model, *Biomaterials* **30**, 2716-23.
82. Sato, M, Yamato, M, Hamahashi, K, Okano, T and Mochida, J (2014) Articular cartilage regeneration using cell sheet technology, *Anat Rec (Hoboken)* **297**, 36-43.
83. Yaguchi, Y, Murakami, D, Yamato, M, Hama, T, Yamamoto, K, Kojima, H, Moriyama, H and Okano, T (2013) Middle ear mucosal regeneration with three-dimensionally tissue-engineered autologous middle ear cell sheets in rabbit model, *J Tissue Eng Regen Med* **10**, E188–E94.
84. Kanzaki, M, Yamato, M, Takagi, R, Kikkawa, T, Isaka, T, Okano, T and Onuki, T (2013) Controlled collagen crosslinking process in tissue-engineered fibroblast sheets for preventing scar contracture on the surface of lungs, *J Tissue Eng Regen Med* **7**, 383-91.
85. World Health Organization ホームページ <<http://www.who.int/en/>>.
86. Deshpande, N, Hewston, P and Yoshikawa, M (2015) Age-associated differences in global and segmental control during dual-task walking under sub-optimal sensory conditions, *Hum Mov Sci* **40**, 211-9.

87. Katanoda, K, Marugame, T, Saika, K, Satoh, H, Tajima, K, Suzuki, T, Tamakoshi, A, Tsugane, S and Sobue, T (2008) Population attributable fraction of mortality associated with tobacco smoking in Japan: a pooled analysis of three large-scale cohort studies, *J Epidemiol* **18**, 251-64.
88. Roerecke, M, Shield, KD, Higuchi, S, Yoshimura, A, Larsen, E, Rehm, MX and Rehm, J (2015) Estimates of alcohol-related oesophageal cancer burden in Japan: systematic review and meta-analyses, *Bull World Health Organ* **93**, 329-38C.
89. がん情報サービスホームページ <<http://ganjoho.jp/public/index.html>>.
90. Gotoda, T, Kondo, H, Ono, H, Saito, Y, Yamaguchi, H, Saito, D and Yokota, T (1999) A new endoscopic mucosal resection procedure using an insulation-tipped electrosurgical knife for rectal flat lesions: report of two cases, *Gastrointest Endosc* **50**, 560-3.
91. Kobayashi, S, Kanai, N, Ohki, T, Takagi, R, Yamaguchi, N, Isomoto, H, Kasai, Y, Hosoi, T, Nakao, K, Eguchi, S, Yamamoto, M, Yamato, M and Okano, T (2014) Prevention of esophageal strictures after endoscopic submucosal dissection, *World J Gastroenterol* **20**, 15098-109.
92. Isomoto, H, Yamaguchi, N, Minami, H and Nakao, K (2013) Management of complications associated with endoscopic submucosal dissection/ endoscopic mucosal resection for esophageal cancer, *Dig Endosc* **25 Suppl 1**, 29-38.
93. Ohki, T, Yamato, M, Ota, M, Takagi, R, Murakami, D, Kondo, M, Sasaki, R, Namiki, H, Okano, T and Yamamoto, M (2012) Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets, *Gastroenterology* **143**, 582-8 e1-2.
94. Kanai, N, Yamato, M, Ohki, T, Yamamoto, M and Okano, T (2012) Fabricated autologous epidermal cell sheets for the prevention of esophageal stricture after circumferential ESD in a porcine model, *Gastrointest Endosc* **76**, 873-81.
95. Takagi, R, Yamato, M, Murakami, D, Kondo, M, Ohki, T, Sasaki, R, Nishida, K, Namiki, H, Yamamoto, M and Okano, T (2011) Fabrication and validation of autologous human oral mucosal epithelial cell sheets to prevent stenosis after esophageal endoscopic submucosal dissection, *Pathobiology* **78**, 311-9.

96. Takagi, R, Kobayashi, S, Yamato, M, Owaki, T, Kasai, Y, Hosoi, T, Sakai, Y, Kanetaka, K, Minamizato, T, Minematsu, A, Kondo, M, Kanai, N, Yamaguchi, N, Nagai, K, Miyazaki, Y, Takeda, N, Fukai, F, Asahina, I, Miyazaki, T, Kohno, S, Yamamoto, M, Nakao, K, Eguchi, S and Okano, T (2015) How to prevent contamination with *Candida albicans* during the fabrication of transplantable oral mucosal epithelial cell sheets, *Regen Ther* **1**, 1-4.
97. 金井信雄, 大和雅之 (2015) 【細胞シート再生医療】 細胞シート食道再生治療 日本・欧州で治験へ, *細胞* **47**, 374-7.
98. Kasai, Y, Sugiyama, H, Takagi, R, Kondo, M, Owaki, T, Namiki, H, Okano, T, Takeda, N and Yamato, M (2016) Brush biopsy of human oral mucosal epithelial cells as a quality control of the cell source for fabrication of transplantable epithelial cell sheets for regenerative medicine, *Regen Ther* **4**, 71-7.

## 第二章 上皮細胞シートの細胞ソース評価のためのブラシバイオ プシーウェスタンブロットティング手法の構築

Kasai, Y, Sugiyama, H, Takagi, R, Kondo, M, Owaki, T, Namiki, H, Okano, T, Takeda, N and Yamato, M (2016) Brush biopsy of human oral mucosal epithelial cells as a quality control of the cell source for fabrication of transplantable epithelial cell sheets for regenerative medicine, *Regen Ther* 4, 71-7.[1] より改変・転載

### 2.1 諸言

#### 2.1.1 安全な治療を目的とした細胞シートの品質管理

安全な細胞シート治療のためには正常な細胞を用いて確実に細胞シートを作製することが求められており、これには品質管理技術が重要である。現在は標準作業手順書（Standard operating procedure, SOP）を事前に作成し、東京女子医科大学ならびに厚生労働省の認可を経て、これに準じた手順で臨床試験が行われている。

この SOP では、まず患者の既往歴を確認することが定められている。口腔粘膜組織を採取する 2 週間前にはヒト免疫不全ウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス、ヒト B 型肝炎ウイルス、ヒト C 型肝炎ウイルス、梅毒といった感染症の検査を行い、血液検査終了後に自家血清を調製する。口腔粘膜組織の採取時には、生検部位の状態を口腔外科医が目視で確認する。その後歯磨きをし、イソジンで消毒した後にスピンドルバイオプシーによって口腔粘膜組織を採取している。培養工程では人為的過誤を防止するために作業者と指示・記録者の二手に分かれて、防塵着を装着後に CPC へ入室して培養中の無菌性を確保する。また、培養開始から 5 日後、8 日後、10 日後、12 日後、13 日後、14 日後、15 日後という決められた日程で培地交換や細胞の観察を行い、細胞形態や増殖能力の確認を行っている。細胞シート出荷時にも、細胞がシート状に剥離できるかどうかの剥離試験、生細胞率のカウント、フローサイトメーターを用いたケラ



チンの陽性率の評価による上皮細胞の純度の算出などを実施している[2]。このような品質管理によって安全性の高い臨床研究が行われているが、改善の余地もある。

### 2.1.2 患者口腔粘膜の性状評価の現状

細胞シートを用いた治療法の確立の為には、患者の個人差を考慮することが重要である。

上皮細胞は *in vitro* での培養を経ても細胞間接着の維持やケラチンフィラメントの発現などの上皮組織の特性をある程度保つため、細胞ソースである口腔粘膜上皮細胞の性状が細胞シートの品質に反映されやすい。現在まで上皮細胞シート移植後に癌化した症例報告はないが、細胞ソースである患者の口腔粘膜上皮細胞が癌や前癌病変の性質を示した場合、移植した細胞シートが癌の原発巣になるリスクがあると考えられる。食道癌と口腔癌はどちらもアルコール摂取や喫煙がリスクファクターとされており、食道癌患者が口腔前癌病変を発症している、あるいは口腔癌を併発していることが少なくない。したがって、細胞シート移植治療の安全性を担保するためには、個人差がある患者の口腔粘膜上皮の性状を十分に検査する必要がある。

現在行われている口腔粘膜の性状診断は口腔外科医による目視診察であるが、この診断方法は客観性に乏しいため確定診断には、組織を外科的に採取して病理診断を行うことによって確認している。

### 2.1.3 ケラチンフィラメント

採取後の上皮組織を病理診断する際に有用なタンパク質の一つにケラチン (Keratin, K) が知られている。ケラチンは上皮組織ならびに毛や爪などに特異的に発現する中間径フィラメントであり、上皮組織では部位や分化度合によって多様なサブタイプの発現パターンが異なるといった特徴から、上皮の性質を診断できるタンパク質とされている。

ヒトの上皮細胞では 23 種類のケラチンが見い出されており、ゲノムの解析からは、毛などに特異的なものや機能が未知なものまで含めると 54 種類のケラチンがあると推定されている[3]。

ケラチンは分子量の大きい順に番号がつけられており、I型（酸性）と、II型（中性あるいは塩基性）のケラチン鎖が共有結合によってヘテロ二量体を形成していることが多く、身体の部位毎や重層扁平上皮の層毎にケラチンが[4, 5]。K8はK18と共に、発生の過程で最も早く発現し、一般的には単層上皮のケラチンとされている。K18は、重層扁平上皮でもK7、K19と共に基底層に発現している場合がある。さらに重層扁平上皮の基底層にはK5、K14、K15が発現しているが、分化に伴って、発現量が低下していく。一方で、表皮などの角化重層扁平上皮組織ではK1、K2、K9（K9は踵の上皮組織などの高度に分化した細胞が発現する）、K10、K16が分化に伴って発現する。その他、透明性の維持が重要な角膜上皮には特異的にK3とK12が発現する。このように、分化の度合や組織の違いによってケラチンの発現が異なるため、上皮の性質を解析するのに適したタンパク質とされている。

口腔粘膜上皮は、重層扁平上皮組織の特に粘膜上皮に分類され、表面は粘液により、潤いがある。この粘膜上皮は分化するとK4とK13が発現する。歯肉や硬口蓋などの粘膜でかつ角化重層扁平上皮組織では、角化と粘膜の両方に特徴的なケラチンがいずれも発現する。この粘膜上皮である口腔粘膜上皮組織における代表的なケラチンのサブタイプとそれらの発現部位を図2-1に示す[5, 6]。

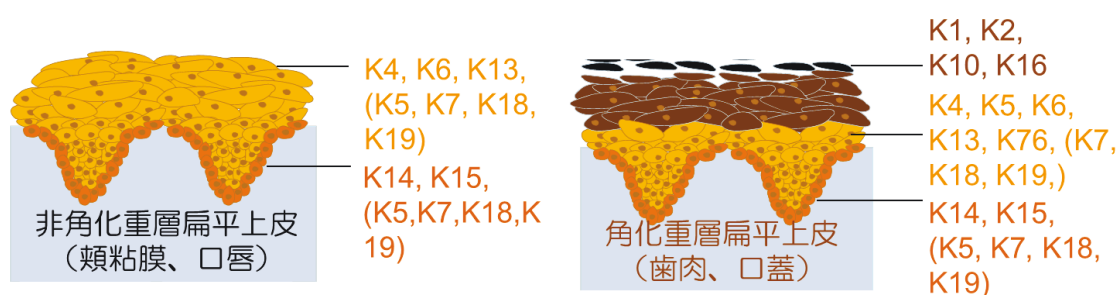


図 2-1. 粘膜上皮の非角化重層扁平上皮および角化重層扁平上皮におけるケラチンの発現パターン。解析対象とした非角化重層扁平上皮である頬粘膜と口唇（左図）、角化重層扁平上皮である歯肉と口蓋（右図）。括弧内は、論文によっては記載していない場合もあるケラチン。

## 2.1.4 口腔前癌病変である白板症のケラチン発現パターン

病理診断による確定診断の場合、外科手術で採取した口腔粘膜組織はパラフィンブロックに包埋した後、ミクロトームで薄切切片を作製し、免疫染色などによって解析する。

第一章で論述したケラチンの発現パターンを免疫染色によって評価すると、白板症や扁平苔癬では口腔上皮の上層で K4、K13 の発現が低下し、K1、K8、K10、K14、K15、K17 の発現が上昇することが確認されている（図 2-2）[7-13]。

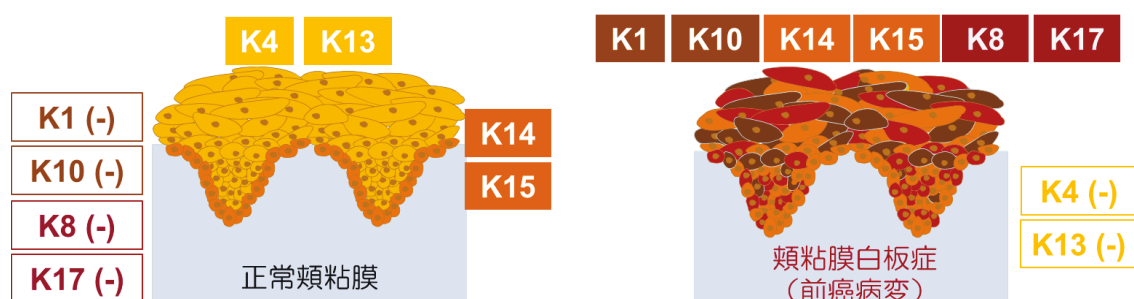


図 2-2. 正常口腔粘膜組織と扁平苔癬のケラチンの発現パターンの違い。各ケラチンの発現と色は対応させている。(左図) 正常頬粘膜上皮においては K4、K13 が上層で陽性、基底層で K14 と K15 が陽性であるが、K1、K10 は陰性である。(右図) 前癌病変である白板症や扁平苔癬の場合、K1、K8、K10、K14、K15 が陽性で K4 と K13 が陰性に近づいていく [7-13]。

さらに、ケラチンだけでなく、ErbB4 受容体が白板症で発現し、 $\alpha$ -defensin がカンジダ症で発現する[14, 15]。このようにタンパク質発現解析を行うことで、組織の性状を医師の経験よりも客観的に判断できると考えられ、確定診断に用いられている。しかしながら、この検査方法は口腔粘膜を外科的に切除して試料を作製する必要があるため、検査後に自家口腔粘膜上皮細胞を用いた細胞シートを作製する場合には再度、細胞ソースとして組織を切除しなければならない。この口腔粘膜上皮組織の切除は 1 時間にわたり、麻酔下で出血を伴う手術であり、これを 2 度行うのは患者への負担が大きく、全ての対象患者で行うのは非現実的である。このことから、簡便かつ低侵襲的に細胞を採取し、タンパク質の発現を高い精度で解析できる手法が求められている。

### 2.1.5 ブラシバイオブシー

低侵襲的に上皮細胞を採取する方法として、ブラシバイオブシーがある。このブラシバイオブシーは、まず歯ブラシなどを用いて上皮組織を擦過して細胞を採取し、続いてパパニコロウ染色などにより細胞形態診断や mRNA 発現解析法によって口腔癌などの検査を行う手法である（図 2-3）[16, 17]。

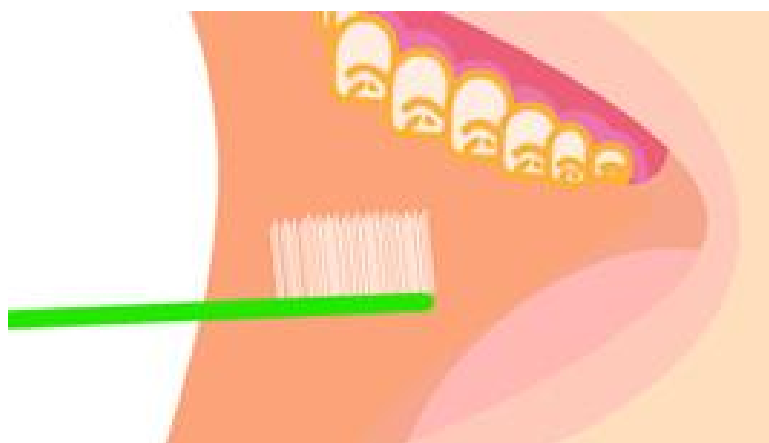


図 2-3. ブラシバイオブシーの模式図。ブラシを擦過させることによって、低侵襲的に粘膜上皮を採取する方法。【[1]より改変・転載】

パパニコロウ染色の場合、細胞形態での診断であるために判断指標が明確でなく、診断に困難を要する場合がある。また、口腔内の唾液には RNA 分解酵素が含まれているため[18]、RNA 抽出が阻害されるとの問題点もある[19]。そこで本研究では低侵襲かつ迅速にタンパク質の発現解析ができる実験系の確立を目的とした。タンパク質発現解析は免疫染色の他にもウェスタンブロッティングがあり、発現の定性的データに加え、タンパク質の分子量の情報からも検出分子を解析することができるため、免疫染色同様に精度と客観性が高い。このことから、低侵襲的に粘膜細胞を採取できるブラシバイオブシーとタンパク質発現解析のウェスタンブロッティングを組み合わせ、低侵襲的かつ定性的な口腔粘膜上皮の性状を確認する新たな手法の開発を目指した。その第一段階として、本研究では試料に健常人の口腔粘膜上皮を用いた。また、上皮の性状判断に有用なケラチンを、ウェスタンブロッティングの解析対象とした。

歯肉の付着歯肉上皮と口蓋の硬口蓋上皮は咀嚼の力に耐え得る強度の高い角化重層扁平上皮に分類され、また、頬粘膜と口唇は咀嚼のために柔軟性がある非角化重層扁平上皮に分類される。このように、口腔粘膜上皮は部位によって性質が異なる。本手法では、組織特異的なケラチン発現パターンの差異をブラシバイオプシーウエスタンプロッキングで検出可能であるかを検討するために、口腔内の上記4つの組織を対象として実験を行った。

## **2.2 材料と方法**

### **2.2.1 材料**

#### **2.2.1.1 実験サンプル**

- ・健康かつ非喫煙者の 20 代の男女 4 人
- ・ヒト口腔組織 凍結/パラフィンブロック（頬粘膜、歯肉、口唇、口蓋）  
（ABS151103512, Analytical biological services）
- ・ヒト角膜組織（Northwest lions eye bank）

#### **2.2.1.2 試薬**

ウエスタンブロッティングに使用した試薬

- ・ Laemmli sample buffer（161-0737, Biorad）
- ・ 2-mercaptoethanol（131-14572, 和光純薬工業）
- ・ プロテアーゼ・ホスファターゼインヒビター（5872S, Cell signaling）
- ・ ブロッキング剤（ECL prime blocking agent; RPN418V, GE healthcare）または  
（Nonfat dry milk; 9999, Cell signaling）
- ・ 10% Tween 20 solution（161-0781, Biorad）
- ・ 10x トリス緩衝生理食塩水（TBS; 170-6435, Biorad）
- ・ Dulbecco's phosphate buffered saline 10 ×（PBS; 11482-15, ナカライテスク）
- ・ 発光基質（ECL prime western blotting detection system; RPN2232, GE healthcare）
- ・ ポリアクリルアミドゲル（NuPAGE® novex 4-12% bis-tris gel; NP0336, Thermo fisher scientific）
- ・ 電気泳動バッファー（NuPAGE MES SDS running buffer; NP0002, Thermo fisher scientific）
- ・ 分子量マーカー（Precision plus protein™ all blue standards; 1610373, Biorad）
- ・ ニトロセルロースメンブレン（iBlot® gel transfer stacks nitrocellulose; IB3010, Thermo fisher scientific）
- ・ 10% Tween 20 solution (1610781, Biorad)

- HRP 標識二次抗体 (Rabbit) (NIF824, GE healthcare)
- HRP 標識二次抗体 (Mouse) (NIF825, GE healthcare)

免疫染色に使用した試薬 (第三章でも使用)

- ChemMate ENVISION キット/HRP(DAB)-ユニバーサル (K5007, Dako)
- Peroxidase blocking reagent (S2023, Dako)
- ヘマトキシリン (30141, 武蔵化学)
- エオシン (32042, 武蔵化学)
- キシレン (245-00717, 和光純薬工業)
- エタノール (055-00457, 和光純薬工業)
- ブロッキングバッファー (06349, ナカライテスク)
- クエン酸バッファー (S1699, Dako)
- プロテアーゼ K (S3020, Dako)
- 4% パラホルムアルデヒド固定液 (Paraformaldehyde fixative, PFA; 3311-1, 武藤化学)
- 非水溶性封入剤 マウントクイック (DM-01, コスモバイオ)

### 2.2.1.3 使用器具・機器

- ミクロトーム (RM2245, Leica)
- クリオスタット (Hyrax C50, マイクロ・エッジ・インスツルメント)
- MAS コートスライドガラス (SMAS-01, 松浪硝子工業)
- 電圧調節装置 (AE-8270 power station 500VC, Atto)
- 電気泳動装置 (XCell surelock mini-cell, Invitrogen)
- 転写装置 (iBlot™ゲルトランスファーシステム, Invitrogen)
- メンブレン撮影装置 (LAS-4000 mini, 富士フィルム)

#### 2.2.1.4 第二章使用抗体

表 2-1. 第二章で用いた抗体と希釈条件

抗体名	クローン	ウエスタンブ ロットティング 希釈濃度	免疫染色 希釈濃度	カタログナンバーと会社名
K1	34βB4	1/1000	1/100	NCL-CK1, Leica
K2	Ks 2.342.7.4	1/1000	1/100	65191, Progen
K4	6B10	1/1000	1/20	ab9004, Abcam
K5	XM26	1/1000	1/100	NCL-CK5, Novocastra
K6	Ks6.KA12	1/1000	1/100	sc-58735, Santa cruz
K7	LDS-68	1/1000	1/50	C6417, Sigma
K8	M20	1/1000	1/50	sc-52324, Santa cruz
K9	Ks9.70/Ks9.216	1/1000	1/20	651104, Progen
K10	LHP1	1/1000	1/50	NCL-CK10, Novocastra
K12	N-16	1/1000	1/50	sc-17098, Santa cruz
K13	1C7	1/1000	1/50	ab22685, Abcam
K14	RCK107	1/500	1/50	sc-23878, Santa cruz
K15	LHK15	1/100	1/100	sc-47697, Santa cruz
K16	LL025	1/1000	1/20	ab8741, Abcam
K17	EP1623	1/1000	1/100	ab109725, Abcam
K18	CK-18	1/1000	1/50	ab82254, Abcam
K19	RCK108	1/1000	1/100	M0888, Dako
K20	EPR1622Y	1/1000	1/100	ab76126, Abcam
p63	4A4	1/1000	1/50	sc-8431, Santa cruz
β-actin	13E5	1/1000	-	4970, Cell signaling

【[1](#)】より改変・転載】



## 2.2.2 実験方法

### 2.2.2.1 ブラシバイオプシー法によるサンプリング

本実験ではヒト検体を用いるため、東京女子医科大学倫理委員会の承認ならびにボランティアドナーの許可を得て実験を進めた。20代の健常者4人をドナーに選び、歯磨き後、無麻酔下で各ドナーから口腔内の頬粘膜、歯肉、口唇および口蓋の粘膜上皮をドナー自身が歯ブラシで10-20回擦り、絡めとった細胞を5 mLのリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline, PBS）に懸濁した（図2-4）。

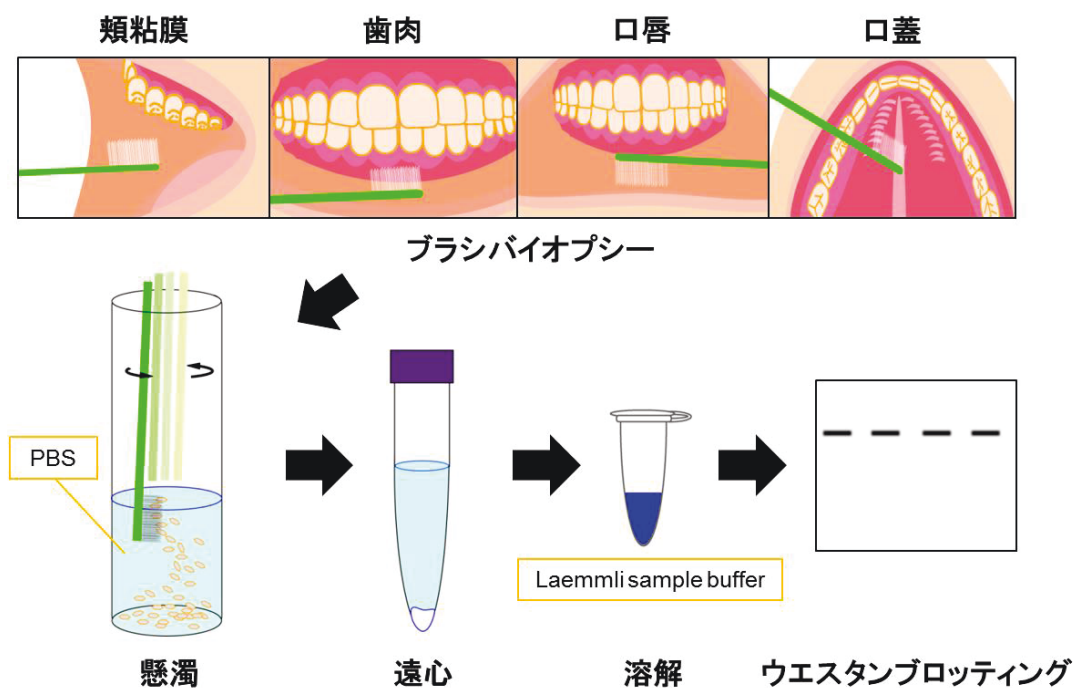


図 2-4. 本研究における実験方法。歯ブラシを用いて、口腔粘膜の4か所から上皮細胞を採取する。PBS内で懸濁し、遠心分離を経て、サンプリングする。【[1](#)】より改変・転載】

この細胞懸濁液を1000 rpm、5分間、4℃の条件で遠心し、上清を除去した。洗浄のために再び5 mLのPBSで懸濁し、遠心した後、上清を除去した。Laemmli sample bufferは界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム（Sodium dodecyl sulfate, SDS）と電気泳動を確認できるブロモフェノールブルーが入っており、

ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）用の試薬である。この Laemmli sample buffer にタンパク質の S-S 結合を切断する還元剤である 2-mercaptoethanol を 20 倍希釈になるように、プロテアーゼ・ホスファターゼインヒビターを 100 倍希釈になるようにそれぞれ加え、タンパク質抽出バッファーとした。この調製したタンパク質抽出バッファーを 250  $\mu$ L ずつ細胞に加えた。DNA はタンパク質を繋ぎとめる働きがあるため、電気泳動の妨げになることが多い。これを防ぐため、21 径注射針による DNA 剪断と 5 分間のソニケーションを細胞試料に施した。剪断の際にできた気泡を 12000 rpm、1 分間、4°C の条件の遠心によって除去した後、タンパク質を一本鎖のポリペプチド鎖へと変性させるために 95°C で 5 分間反応を行った。12000 rpm、5 分間、4°C の条件で遠心し、上清を回収し、1.5 mL チューブを用い、-80°C で保存した。沈殿物は不溶性画分として除去した。

また、ポジティブコントロールの試料には抜歯の際に得られたヒト歯肉組織、または、ヒト角膜組織を用いた。得られた検体の血液ならびに汚れを生理食塩水で洗浄し、イソジン殺菌を行った後に再び生理食塩水で洗浄した。この組織から結合組織を取り除くため、10000 U に調製したディスパーゼを 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 時間反応させ、ピンセットを用いて結合組織と上皮組織に単離した。上皮組織を生理食塩水で十分に洗浄した後、タンパク質抽出バッファーを用いて、ブラシバイオプシーサンプルと同様の操作を行った。

#### 2.2.2.2 癌細胞の培養

本手法が、正常組織と口腔癌細胞の差異を検出し得るかどうかを検討するため、正常組織のブラシバイオプシーサンプルならびに頬粘膜扁平上皮癌細胞株である HO-1-N-1 と口腔粘膜上皮癌細胞株の HSC-2 を用いて比較実験を行った。また、ポジティブコントロール実験には、ヒト乳腺癌細胞株の MDA-MB-231、ヒト表皮角化細胞株の HaCaT も用いた。HO-1-N-1 は DMEM と F-12 を 1 : 1 で混合させた後、10% になるように FBS を加えた培地で培養した。HSC-2 と MDA-MB-231、HaCaT は、FBS 濃度を 10% に調製した DMEM を用いて培養した。35 mm 培養皿の 80-90% コンフルエントまで培養した後、PBS で洗浄し、300  $\mu$ L

のタンパク質抽出バッファーを用いてブラシバイオプシーサンプルと同様にタンパク質を抽出した。

### 2.2.2.3 SDS-PAGE

Laemmli sample buffer と、2-mercaptoethanol の混合溶液で処理したタンパク質は、一本鎖のポリペプチド鎖になり負に帯電する。この一本鎖のタンパク質は、ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で、分子量の違いにより分離できる。

電気泳動装置にポリアクリルアミドゲルを取り付け、電気泳動バッファーを加えた。分子量マーカーと各サンプルをカラムへ入れ、200 V、120 mA の条件下で電気泳動し、サンプルがゲルの 8 割程度まで進んだ時点で電気泳動を終了させた。

### 2.2.2.4 ウェスタンブロッティング

10% トリス塩酸緩衝液 (Tris-buffered saline, TBS) と 0.1% Tween で作製した洗浄用バッファー (TBS-T) と、この TBS-T にブロッキング剤を 2-5% の濃度に調製し、ブロッキングバッファー溶液とした。

前節に記載した電気泳動後のゲルを、ニトロセルロースメンブレン上に静置させてセミドライ式転写装置を用いて 23 V、6 分の条件でタンパク質の転写を行った。このタンパク質が転写されたメンブレンを調製したブロッキングバッファー溶液に浸し、4℃で 1 時間以上振盪させてブロッキングを行った。所定の濃度に調製した一次抗体のブロッキングバッファー溶液 (表 2-1) にメンブレンを浸して 4℃で一晩振盪させ、抗原抗体反応を行った。その後、一次抗体溶液を除去し、TBS-T で 2、2、15、5、5、5 分の計 6 回振盪洗浄した。1/10000-20000 の濃度になるように調製した HRP 標識二次抗体のブロッキングバッファー溶液を調製し、メンブレンを浸して常温で 1 時間反応させた。続いて、上述と同様の条件で 6 回の振盪洗浄を行った。二次抗体の HRP と反応する発光基質をメンブレンに加えて 5 分間反応させた後、LAS4000 で撮影した。

### 2.2.2.5 口腔組織切片の作製

ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングの有効性を示すコントロール実験として免疫染色を行った。本来は同一ドナーからの試料でコントロール実験を行うのが望ましいが、侵襲性と倫理的観点から、ヒト口腔粘膜のパラフィンプロックおよび凍結ブロック試料は購入した。凍結ブロックはクライオスタットを用いて 5  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切り、MAS コートされたスライドガラスに転写した。この凍結切片は室温で 1 時間風乾させた後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また、パラフィンプロックはマイクロトームを用いて 5  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切り、MAS コートされたスライドガラスに転写した。 $40^{\circ}\text{C}$  で 1 晩風乾させた後、室温で保存した。

### 2.2.2.6 免疫組織化学的染色

パラフィン切片の場合、パラフィンと親媒性があるキシレンに各 5 分間で 3 回、キシレンと親媒性がある 100%エタノールを各 2 分間で 4 回浸して、パラフィンを除去し、組織が水和できるようにした。さらに、70%エタノールに各 2 分間で 2 回浸して水を徐々に浸透させた後、蒸留水に各 5 分間で 2 回浸して完全に水和させた。パラフィン切片の場合、クエン酸バッファーを用いた  $125^{\circ}\text{C}$ 、30 秒の加熱処理または、6-10 分のプロテアーゼ K 処理によって抗原を賦活化させた。一方で、凍結切片は 1 時間以上風乾させた後に PBS で 5 分間洗浄し、コンパウンドを除去して組織を暴露させた。用いる発光基質は、ウエスタンブロッティングと同様にペルオキシダーゼ発色基質のジアミノベンジジン (3,3'-diaminobenzidine, DAB) であるため、ペルオキシダーゼブロッキング液を滴下し、室温で 10 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。PBS で各 5 分間、2 回洗浄した後、5%ロバ血清含有 PBS または専用のブロッキングバッファーを滴下し、室温で 1 時間ブロッキングを行った。1%ロバ血清含有 PBS またはブロッキングバッファーで所定の濃度に希釈した一次抗体を滴下し、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させた。PBS で各 5 分間、3 回洗浄した後、1%ロバ血清含有 PBS で 1/1000 に希釈した二次抗体、または専用のキットを滴下し、室温で 1 時間反応させた。発色基質である DAB を滴下して発色具合を見ながら 1-10 分反応させ

た後、蒸留水で反応停止ならびに洗浄を行った。ヘマトキシリン液に 1 分間入れて核染色を行い、水道水で洗浄した。70%エタノールに 1 回、100%エタノールに 4 回サンプルを浸して脱水を行った後にキシレンに 4 回浸し、マウントクイックを用いて封入を行った。1 晩以上風乾させた後に撮影を行った。

主に凍結切片を用いて組織の免疫染色を行った。しかし、角化組織である硬口蓋は十分な量の凍結切片試料が得られなかったため、角化マーカーである K1、K2、K10、K16 においてはパラフィン切片を用いて免疫染色を行った。

## 2.3 実験結果

### 2.3.1 回収した細胞の評価

ブラシバイオプシーで回収した細胞を PBS で懸濁した後、トリパンブルーで死細胞を染色して観察した（図 2-5）。回収した細胞は青色に染色されたことから、ほぼ死細胞であったことがわかった。さらに、扁平で長軸方向の長さが約 100  $\mu\text{m}$  に達している大きな細胞が数多く観察された。これらの結果より、中間層から上層に分布している分化した重層扁平上皮細胞を採取したと考えられた。各々の細胞が大きくかつ重なり合っていたため正確な細胞数測定は困難であったが、各組織からおよそ  $8.0 \times 10^5$  cells 以上の細胞を採取することができた。この採取した細胞を温度応答性インサート上に播種しても細胞は接着せず、培養によって増殖することもなかった（培養条件は第三章に記載の細胞シート作製時のものと同じ）。また、ブラシバイオプシーによって採取した細胞から RNA を安定して抽出することはできなかった。これらのことから、ブラシバイオプシーで採取した細胞の性状の解析方法は、タンパク質発現解析であるウェスタンブロッティングが有用であると考えられた。

一般的な細胞からのタンパク質抽出と解析は、無色透明で界面活性剤を含む Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer に溶解させ、ビシンコニン酸タンパク質定量法 (Bicinchoninic acid assay, BCA) によってタンパク質量を定量し、その後にブロモフェノールブルーやグリセロールを含む Laemmli sample buffer と混合させた後に SDS-PAGE を行う方法が用いられている。しかし、RIPA lysis buffer ではブラシバイオプシーで採取した細胞を完全に溶解することができなかった。第一章で論じた通り、分化した上皮細胞は Filaggrin などによってケラチンが高度に架橋されて強度が高くなっているため、より強力な界面活性剤を含む試薬が必要であった。したがって、強力な界面活性剤や還元剤を含む Laemmli sample buffer を用いて細胞の溶解を行った。しかしながら、この溶液に含まれるブロモフェノールブルーや還元剤は BCA 解析を阻害し得たため、タンパク質の定量も正確性に乏しかった。このため本研究では定量性を犠牲としても、簡便かつ定性的な組織解析手法の確立を目指した。

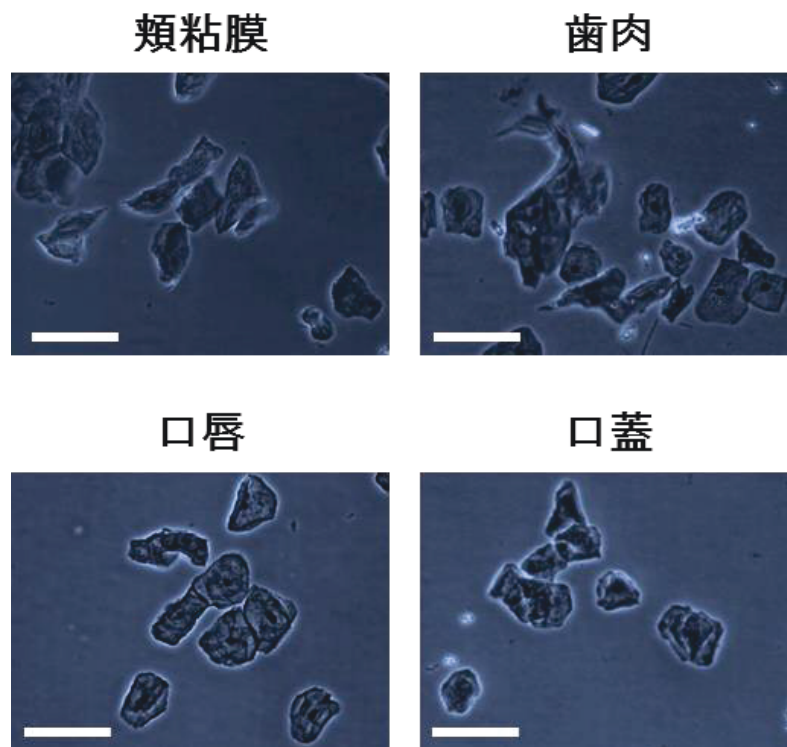


図 2-5. ブラシバイオプシーによって採取した細胞の形態。ブラシバイオプシーで頬粘膜、歯肉、口唇、口蓋から採取した細胞をトリパンプルー染色して観察した。いずれも扁平な死細胞であった。スケールバー：100  $\mu\text{m}$ 。【[1]より改変・転載】

### 2.3.2 ウェスタンブロッティングおよび免疫組織学的手法による口腔上皮評価

ブラシバイオプシーで採取した口腔上皮細胞に対して、18 種のケラチンについてウェスタンブロッティングを行った。

頬粘膜、歯肉、口唇、硬口蓋の 4 種類のサンプルで粘膜上皮に高度に発現する K4、K5、K6、K13、 $\beta$ -actin をウェスタンブロッティングによって解析したところ、全てのサンプルで黒色の検出バンドが得られた。これより、定量的ではないものの、ウェスタンブロッティングに十分な量のタンパク質の抽出ができたことを確認した (図 2-6)。これらの結果は、ボランティアドナーの 4 人全てで再現性よく得られた。口蓋は他の組織と比較すると K4、K13、 $\beta$ -actin の発現が低い傾向があった。これは、口蓋上皮組織は他の組織に比べて細胞数が確保しづらいためと考えられた。さらに、次節で述べる角化重層扁平上皮に特異的なタンパク質の発現もあるため、相対的に発現が低く見積もられると推測され

た。もっとも、ブラシバイオプシーでは必ずしも同量の試料を採取し得ないので、ウエスタンブロッティングのバンドの濃淡には各ドナー間において差異は認められた。

ブラシバイオプシーウエスタンブロッティング法の信頼性を実証するため、既存の組織切片の免疫染色法の解析を行い、比較を行った。口腔組織に対して K4、K5、K6、K13 の免疫染色を行った結果、上皮組織特異的に発現を確認することができた。詳細に組織免疫染色像を観察すると、K4、K6、K13 は基底層に発現がなく、中間層から上層にかけて発現していた。また、K5 は組織免疫染色ではすべての組織の基底層から上層まで発現が確認され、分化して上層に重なった細胞においても発現低下を示さなかった。

これらの結果から口腔粘膜上皮の上層に存在するケラチンの K4、K5、K6、K13 の発現パターンはブラシバイオプシーウエスタンブロッティングによって確実に評価し得ることが明らかになった。



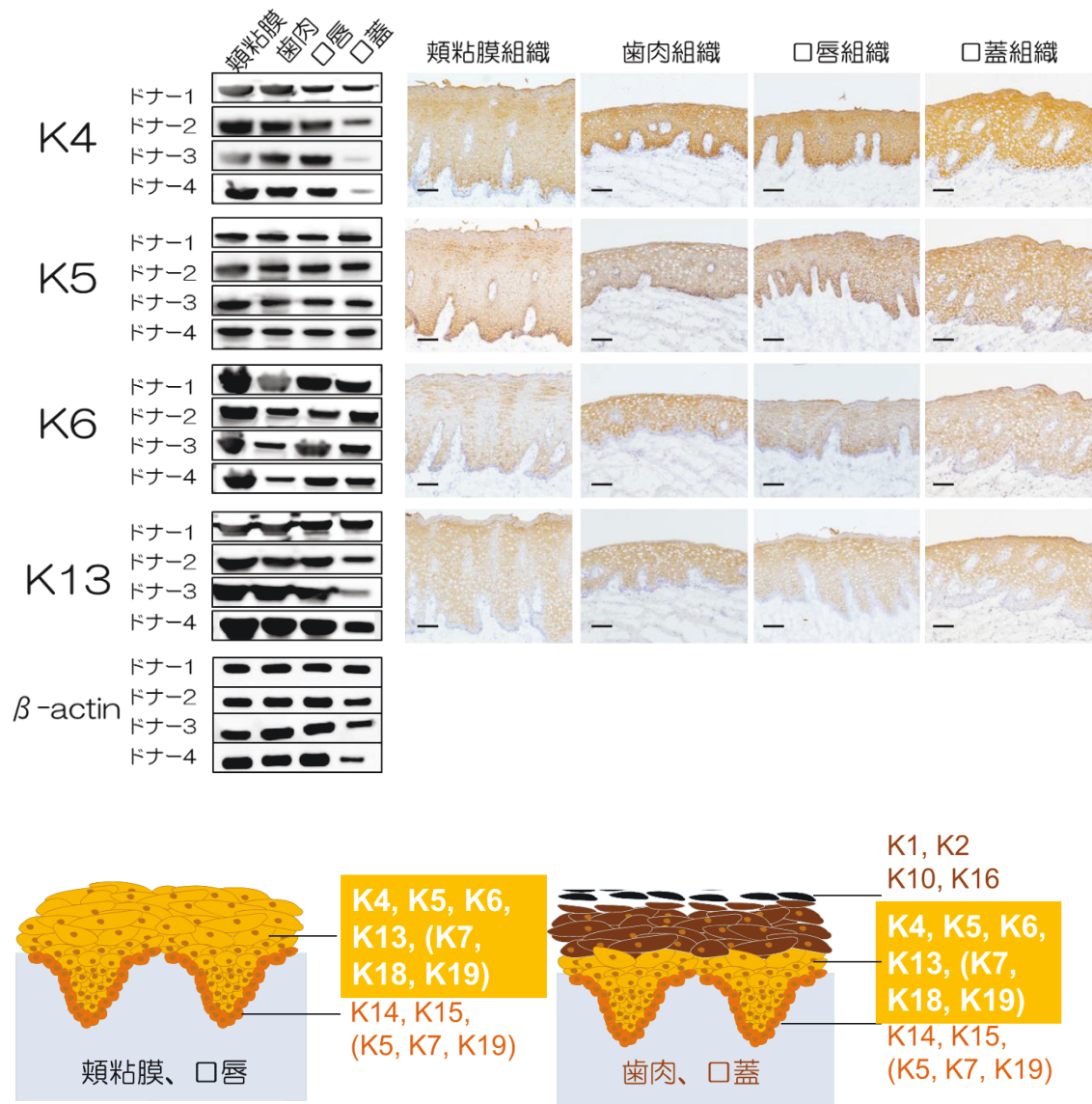


図 2-6. 粘膜上皮マーカーの K4、K5、K6、K13 および、 $\beta$ -actin のブラシバイオプシーウエスタンプロットティング（上段左図、n = 4）と正常ヒト口腔組織免疫染色結果（上段右図）。粘膜上皮の各組織において発現しているケラチンの各分子の分布模式図（下図）[5, 6]。スケールバー：100  $\mu$ m。【[1]より改変・転載】

角化上皮マーカーである K1、K2、K10、K16 が、角化上皮として知られている歯肉と硬口蓋についても、ブラシバイオプシーウエスタンプロットティングで明瞭に検出された（図 2-7）。非角化重層扁平上皮の頬粘膜と口唇では K2 と K10 は検出されなかった。一方で、ドナー4 の頬粘膜においては K1、K16 が検出されたものの、非角化上皮の口唇では K16 はほとんど発現が検出されなかった。

角化上皮マーカーを用いた組織切片の免疫染色は、コントロール試料として入手した口蓋の凍結切片に硬口蓋部位が観察されなかったため、購入したパラフィン切片を用いて行った。口蓋のパラフィン切片には角化上皮組織である硬口蓋だけでなく、非角化上皮組織である軟口蓋も存在していたため、これらの部位を別々に評価した。組織免疫染色の結果、ブラシバイオプシーウェスタンブロッティングと同様に、角化上皮組織である歯肉および硬口蓋に K1、K2、K10、K16 発現が確認することができた。

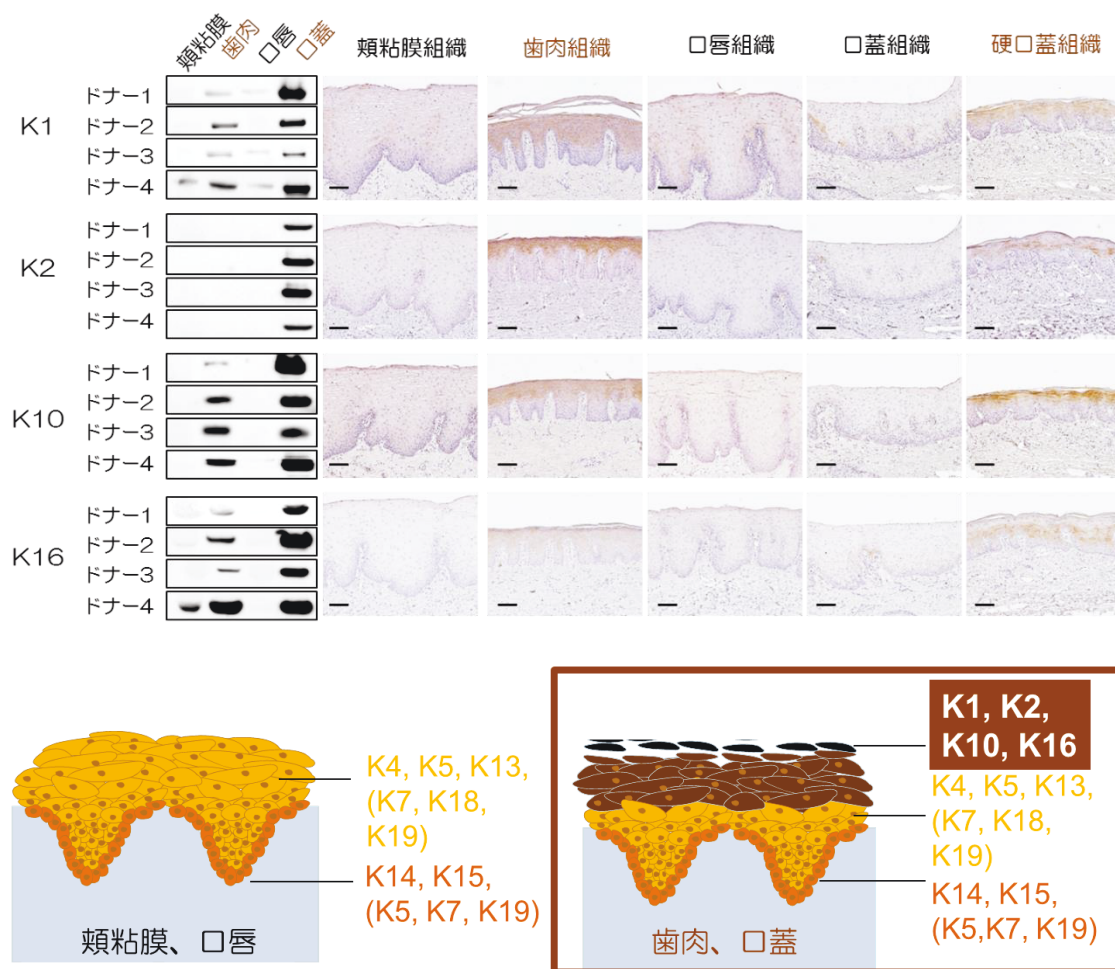


図 2-7. 角化上皮マーカーK1、K2、K10、K16 のブラシバイオプシーウェスタンブロッティング（上段左図、n=4）および正常ヒト口腔組織免疫染色結果（上段右図）。粘膜上皮の各組織において発現しているケラチンの各分子の分布模式図（下図）。スケールバー：100 μm。  
【[1](#)】より改変・転載】

これらの結果より、頬粘膜での K1、K16 の発現の有無はドナー間で差異がある問題は残るものの、ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングは角化上皮と非角化上皮という組織の差異を検出可能な手法であることが示された。

歯肉組織についてはさらに詳細に検討を行った。歯肉組織は、歯や歯槽骨に付着している角化組織である付着歯肉と、口唇につながる非角化組織である歯槽粘膜に別れている[20]。これまでのブラシバイオプシーウエスタンブロッティングでは付着歯肉を意識的に採取した場合であり、図 2-7 のように角化上皮マーカーの K1、K10 の発現が検出された。ここでドナー1、4 が意識的に歯槽粘膜を採取したところ、K1、K10 はほとんど検出されなかった（図 2-8）。付着歯肉を全く含まないように擦過することは難しいため、ドナー1 で K10 がわずかに検出されたものの、角化上皮と非角化上皮を高い感度で検出し得る手法であることが強く支持された。

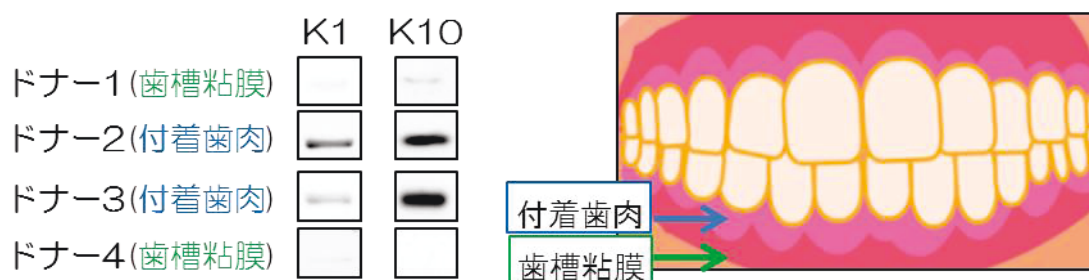


図 2-8. 歯槽粘膜と付着歯肉における K1、K10 のブラシバイオプシーウエスタンブロッティング結果。ドナー1、4 からは歯槽粘膜を、ドナー2、3 からは付着歯肉を意識的に採取した場合の K1、K10 の検出結果 (左図)。歯肉における付着歯肉と歯槽粘膜の分布模式図 (右図)。

【[1]より改変・転載】

さらに基底細胞マーカーである K14、K15、p63 について解析した。この際には、上層から基底層までの上皮組織全てを結合組織から剥離して回収できる酵素のディスパーゼを用いてドナー1 のヒト歯肉組織を処理して、基底層マーカーのコントロールとした (図 2-9)。

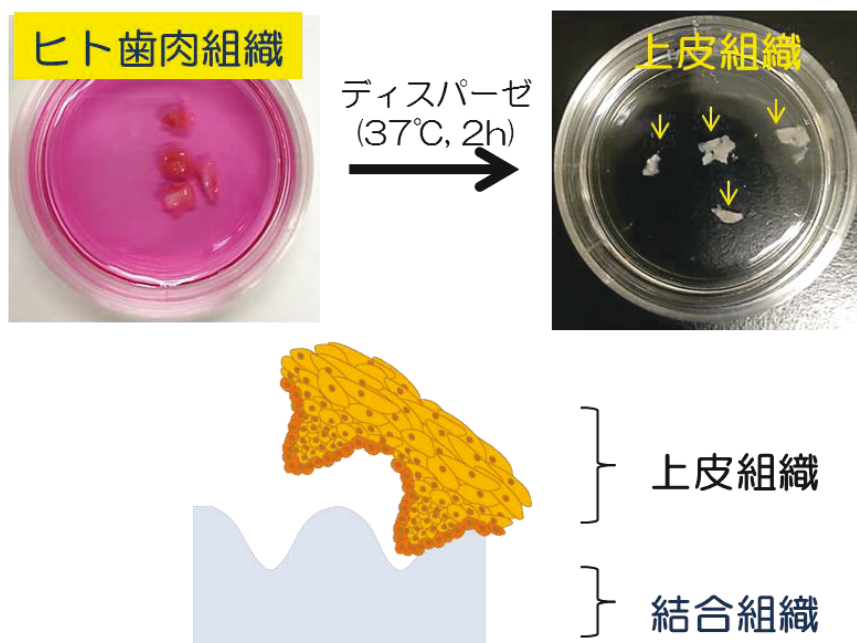


図 2-9. ヒト歯肉上皮組織のサンプリング。



基底層マーカーのブラシバイオプシーウエスタンブロッティングでは口蓋の K14 を除いて発現を確認することができなかった (図 2-10)。一方で、免疫染色では、全ての種類の口腔粘膜上皮組織について上皮基底層で発現が確認された。このことから、ブラシバイオプシーでは基底層の細胞は採取されず、上層から中間層に位置する細胞を採取していることが示された。この結果は、2.3.1 に示した上層上皮細胞の特徴である扁平な細胞形態が見られたことと整合性があった。一方で、ディスパーゼで上皮組織を剥離したヒト歯肉組織ではウエスタンブロッティングによって、基底層マーカーの K14、K15、p63 が検出された (図 2-10)。このコントロール実験の結果より、ウエスタンブロッティングの精度は証明され、ブラシバイオプシーで基底層が採取されないことを強く支持した。

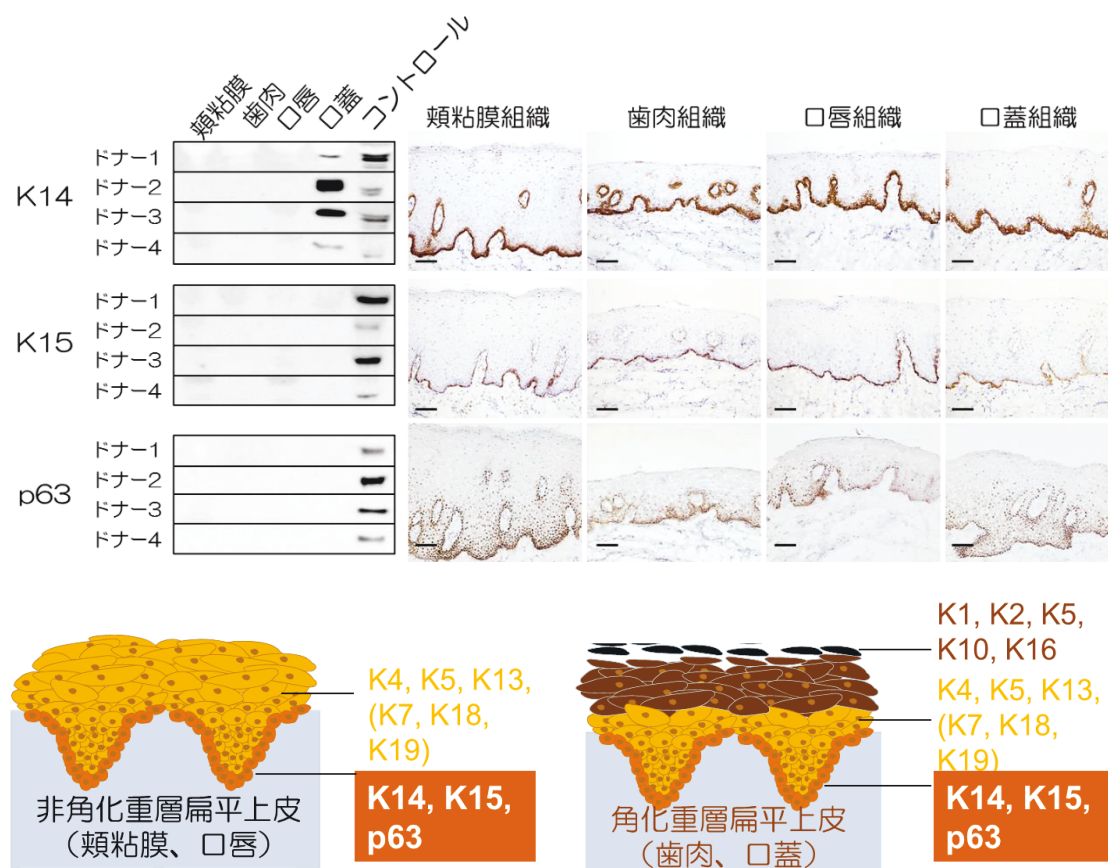


図 2-10. 上皮基底層マーカーK14、K15、p63 のブラシバイオプシーウエスタンブロッティング (上段左図、n = 4) および正常ヒト口腔組織免疫染色結果 (上段右図)。粘膜上皮の各組織において発現しているケラチンの各分子の分布模式図 (下図)。スケールバー : 100  $\mu$ m。

【[1](#)]より改変・転載】

次に K7、K18、K19 について解析を行った。これらはおもに単層扁平上皮にも発現している。このため重層扁平上皮のマーカーとはされにくい、重層扁平上皮にも発現が報告されている[5]。免疫染色実験では、全ての組織で弱い発現が確認された（図 2-11）。この結果を反映するように、ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングでもドナー間で発現強度の差はあるものの、K7、K18、K19 の全てが検出された（図 2-11）。

ウエスタンブロッティングは分子量も確認することができるため、非特異的な検出を除外出来得た。

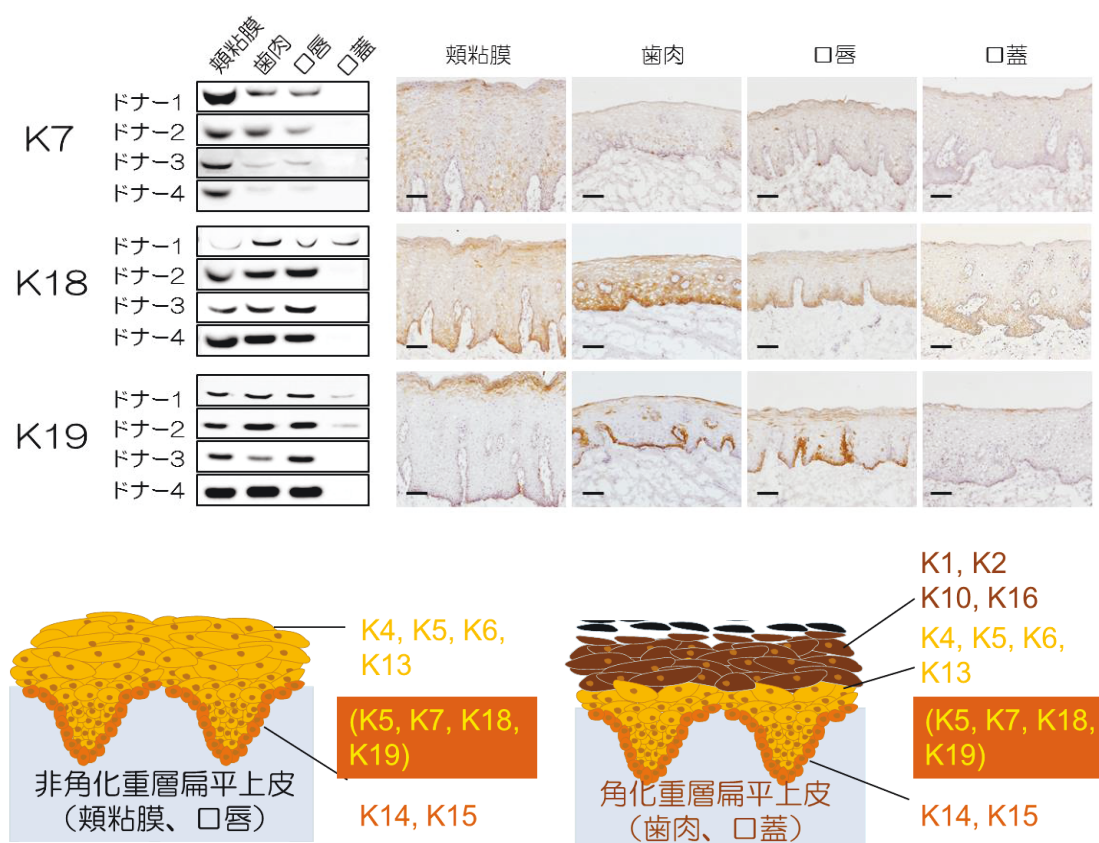


図 2-11. K7、K18、K19 のブラシバイオプシーウエスタンブロッティング (上段左図、n = 4) および正常ヒト口腔組織免疫染色結果 (上段右図)。粘膜上皮の各組織において発現しているケラチンの各分子の分布模式図 (下図)。スケールバー：100  $\mu$ m。【[1]より改変・転載】

最後に K8、K9、K12、K17、K20 について解析を行った。内皮にみられる K8 の発現はブラシバイオプシーウエスタンブロッティング及び免疫染色によって検出されなかったが、癌の診断マーカーの候補にもなり得た (次節に記載)。活

性化誘導ケラチンである K17 は炎症などに反応して発現するため、発現が安定しておらず口蓋で検出されることもあった（次節に記載）。角膜上皮のマーカーである K12 は口腔粘膜上皮からは、いずれの解析方法でも発現が確認されなかったが、ヒト角膜上皮組織を用いたウエスタンブロッティングからは発現が検出され、K12 が角膜で特異的に発現するという過去の知見を反映した結果が得られた。これらの結果も本解析手法の精度の高さを支持した。

掌や足底などに存在する高度に分化した細胞のマーカーである K9、筋上皮、メルケル細胞のマーカーである K20 は免疫染色ならびにブラシバイオプシーウエスタンブロッティングでも発現が確認されなかった（図 2-12）。K9、K20 においては癌細胞である MDA-MB-231 や HO-1-N-1、A-431 や培養細胞の HaCaT、ヒト表皮細胞シート（Normal human epidermal keratinocyte, NHEK; 作製法は第三章に記載）、そして歯肉上皮組織で発現解析を行ったが検出が確認できなかった。K9 と K20 に関しては条件最適化やポジティブコントロールの探索が課題となった。

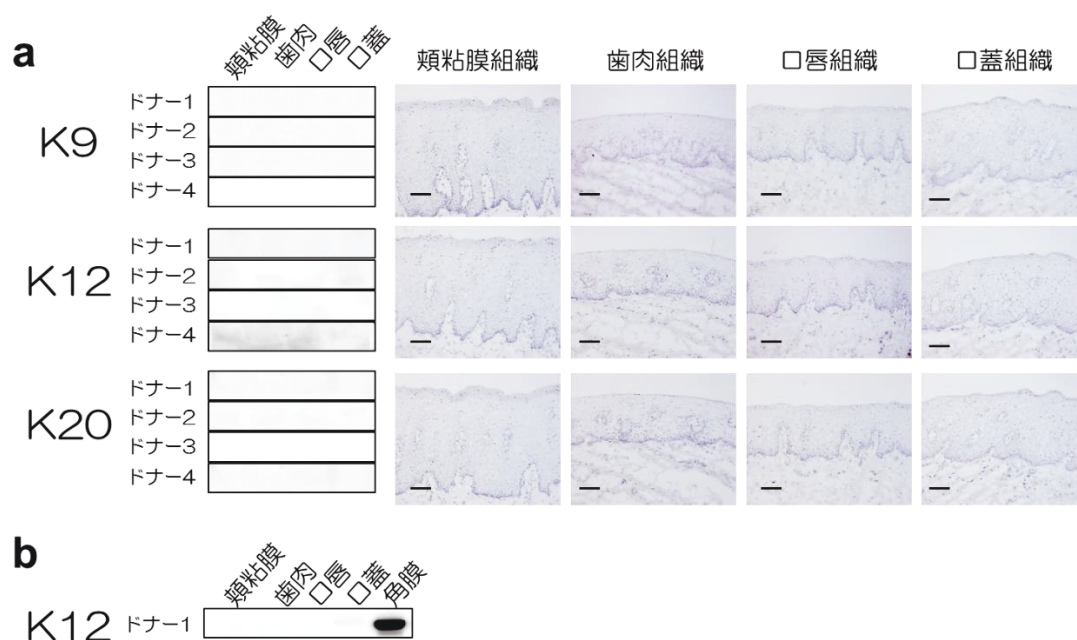


図 2-12. (a) K9、K12、K20 のブラシバイオプシーウエスタンブロッティング（左図、n=4）および正常ヒト口腔組織免疫染色結果（右図）。(b) ヒト角膜上皮組織をコントロールとした K12 発現解析。

これらの正常組織のブラシバイオプシーウエスタンブロッティングの結果のまとめを表 2-2 に示す。

表2-2. ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングと組織免疫染色におけるケラチン発現パターン

	頬粘膜				歯肉				口唇				口蓋			
	組織免疫染色				組織免疫染色				組織免疫染色				組織免疫染色			
	WB	基底層	中間層	上層	WB	基底層	中間層	上層	WB	基底層	中間層	上層	WB	基底層	中間層	上層
K1	(+)	-	(+)	(+)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
K2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
K4	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
K5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K6	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
K7	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)
K8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K10	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
K12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K13	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
K14	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	(+)	+	-	-
K15	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
K16	(+)	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
K17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
K18	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)
K19	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)
K 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: 強く発現、(+): 弱く発現、あるいは変化に富む発現様式、-: 発現なし WB: ウエスタンブロッティング

【[1](#)】より改変・転載】

### 2.3.3 口腔扁平上皮細胞と本手法の比較実験

2.1.4 で論じた通り、正常上皮組織と癌組織ではケラチンの発現パターンに差異があることが知られている。前節までの結果から、ブラシバイオプシーで口腔粘膜上皮組織の上層の細胞を採取し、ウエスタンブロッティングによってタンパク質の発現を解析すれば、正常と癌あるいは前癌病変との差異を検出できる可能性が示唆されている。

この仮説を実証するためには、白板症などの前癌病変患者においてタンパク質発現パターンの変化を判別出来得るかを示す必要がある。一方で、前臨床試験を実施する前に、癌細胞の培養細胞でタンパク質発現のパターンを検証し、判別ができる基礎的知見とすることも有用である。そこで、頬粘膜扁平上皮癌細胞である HO-1-N-1 と口腔扁平上皮癌細胞である HSC-2 の 2 種類の培養細胞を用いて、ブラシバイオプシーのサンプルとケラチンの発現パターンの比較実験を行った。このときブラシバイオプシーのサンプルはドナー1 を用いた。

ケラチンには、癌・前癌病変で発現が変化するという報告がある K4、K8、K14、K15、K17 を対象としてウエスタンブロッティングを行った (図 2-13)。



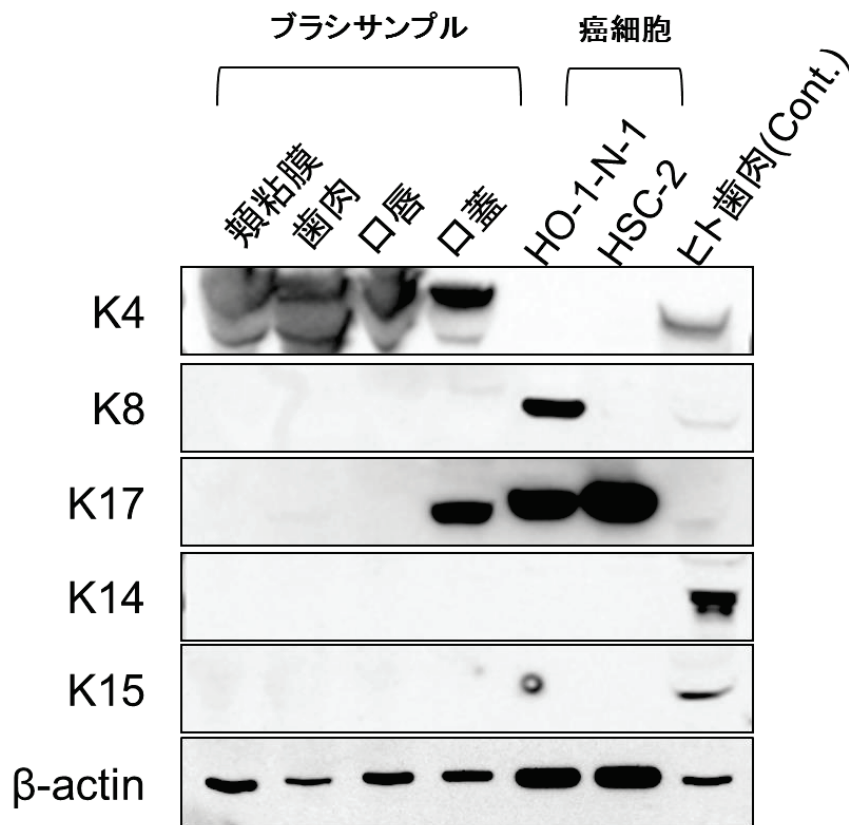


図 2-13. ブラシバイオプシーサンプルと癌細胞の代表的なケラチンの発現パターンのウェスタンブロッティングによる比較実験結果。

基底層細胞のマーカである K14、K15 は、ブラシバイオプシーサンプルと 2 種類の培養癌細胞のいずれからも検出されなかった。これより、口腔上皮癌細胞が必ずしも K14、K15 を発現していないことがわかった。

K4 は、前節の結果と同様にブラシバイオプシーサンプルでは検出された一方で、培養癌細胞では検出されないという差異を確認した。これより、K4 の発現低下が癌を特定する指標になり得ると考えられた。

K8 は、HO-1-N-1 でのみ検出され、病変マーカーになり得ることが示唆された。

K17 は、HO-1-N-1 と HSC-2 の両方から検出され、頬粘膜においては、正常細胞であるブラシバイオプシーサンプルと培養頬粘膜癌細胞の HO-1-N-1 で検出に差異があることを見出した。ただし、口蓋のブラシバイオプシーサンプルからも K17 が検出され、正常の口蓋上皮でも陽性となる場合があることもわかった。

これらの結果から、K4 と K8 で、癌と正常上皮の差異があることを示し、ブラシバイオプシーウェスタンブロッティングは癌や前癌病変と正常上皮組織の差異をタンパク質発現レベルで検出でき得る手法であることを強く支持した。

## 2.4 考察

### 2.4.1 ブラシバイオブシーとウエスタンブロッティングを組み合わせる有用性

本研究では、ブラシバイオブシーとウエスタンブロッティングを組み合わせ、口腔粘膜上皮細胞の新たな解析法の確立に取り組んだ。

ブラシバイオブシーは、歯科用の歯ブラシを用いることで無麻酔下かつ出血なしで何度も実施できるような低侵襲性に優れた細胞の採取法であるが、採取した細胞は、ほぼすべてが扁平な死細胞であった。これより、ブラシバイオブシーによって採取したのは分化した上層の細胞だと考えられた[21]。過去の報告によると、ブラシバイオブシーで採取した口腔癌細胞からは安定して RNA が抽出される一方で、正常口腔粘膜組織では安定的に抽出されないとの報告がある[19]。これは唾液に含まれる RNase によって細胞の RNA が分解されることが一因として考えられるが[18]、死細胞であることも一因だと考察された。これらのことから、ブラシバイオブシーで採取された細胞の解析はタンパク質発現を対象としたウエスタンブロッティングが優れていると考えられた。

### 2.4.2 非角化重層扁平粘膜上皮細胞マーカーの検出の有効性

ブラシバイオブシーウエスタンブロッティングでは、粘膜上皮の分化マーカーである K4、K5、K6、K13 の発現が、頬粘膜、歯肉、口唇、硬口蓋の全てのサンプルからウエスタンブロッティングのバンドが検出された（図 2-6）。すなわちブラシバイオブシーで採取した上記 4 か所の粘膜上皮細胞から、DNA 剪断や変性条件、電気泳動を経てニトロセルロースメンブレンへ転写するまでの条件検討の結果、負に帯電された一本鎖のタンパク質となり、適切にウエスタンブロッティングによる解析ができる手法であることが確認された。ケラチンは、死細胞でも分解されにくいタンパク質であるため[5]、解析に適していたと考えられる。

本実験ではタンパク質の濃度測定は行わなかったが、青色の Laemmli sample buffer を用いても還元剤非存在下の条件下においてはタンパク質の濃度測定が

できる試薬 (Pierce™ 660nm Protein Assay Reagent; 22660, Thermo fisher scientific) で解析する方法や、RIPA lysis buffer に SDS を追加して上皮細胞を完全に溶解すれば、タンパク質濃度も規格化できる可能性もあると考えられる。

K5 については、基底層のマーカーとする報告と[6]、全層に発現するとの報告があるが[5]、本研究で用いた K5 抗体で免疫染色を行うと、全層にわたって発現することを確認し、ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングで検出し得ることを示した。したがって、ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングを行う上で、口腔粘膜上皮のマーカーとすることができると考えられた。

### 2.4.3 角化重層扁平粘膜上皮細胞マーカーの検出の有用性

角化マーカーである K1、K10 は角化組織である歯肉と硬口蓋に発現が見られたのに対し、非角化組織である頬粘膜と口唇には発現がほとんど検出されなかった。これより、ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングでも組織の特性を反映した解析ができると考えられる (図 2-7)。しかし、口唇は角化重層扁平上皮である口腔外の口唇表皮とつながっているため、口唇としてブラシバイオプシーで採取したサンプルに、角化上皮マーカーの K1 が検出される場合もあった[22]。この結果より、ブラシバイオプシーを行う部位を組織学的に正確に認識して試料を採取する重要性が示唆された。また、ドナー4 では非角化組織である頬粘膜でも角化マーカーである K1、K16 がブラシバイオプシーウエスタンブロッティングで検出された (図 2-7)。K1、K16 は頬粘膜でもまばらに存在し、K1 は *in situ* ハイブリダイゼーションにより mRNA の存在も確認されている[7, 12]。このようにマーカー分子の分布が定まっていない組織を本手法の解析対象とする場合は注意を要する。硬口蓋ではすべてのドナーで K1、K2、K10 の発現が確認され、角化組織として適当であったと言える。特に K2 は高度に分化した角化上皮マーカーとされており[5]、歯肉における K2 の発現は、免疫染色では上層に観察されたが、ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングではいずれのドナーからも発現が認められなかった。これは、歯肉における K2 の発現は個人差があると考えられる。したがって、必ずしも免疫染色の結果とウエスタンブロッティングの結果が相関しない場合も考えられるため、複数のマーカー分子を対象とすることも重要と考えられる。

ほとんどのケラチンは 12 番染色体と 17 番染色体上にあり[3]、はエピジェネティックな修飾を受けて発現が制御されていることが *in vitro* の実験で理解されている[23]。本研究では定量性は定めていないものの、口蓋上皮において K1、K10 などのタンパク質が高度に発現するため、K4、K13、K7、K18、K19 の発現が抑制されていることがウエスタンブロッティングの結果の濃淡から考察された(図 2-6、図 2-11)。すなわち、サンプル間のタンパク質量の差異よりも、ケラチンの発現の比率が各組織で異なっているために濃淡に差がある結果が得られたと考えられる。歯肉においては、付着歯肉だけでなく歯槽粘膜が近傍にあるため、同時に歯肉サンプルとして採取されやすい。その結果、K4、K7、K13、K18、K19 の発現が顕著に確認されたと考えられる(図 2-6、図 2-11)。したがって、口蓋にも硬口蓋近傍に軟口蓋が存在しているため、軟口蓋のような非角化組織を中心にブラシバイオプシーによって採取すれば、K4、K7、K13、K18、K19 の発現を顕著に検出し得ると考えられる。

#### 2.4.4 重層扁平粘膜上皮の基底層細胞マーカーの検出の有用性

K14、K15、p63 は免疫染色によって基底層に発現が見られたが、ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングでは頬粘膜、歯肉、口唇で発現を検出できなかった(図 2-10)。これより、ブラシバイオプシーでは基底層までの組織は採取されておらず、上層の細胞を採取していることが示され、低侵襲性が裏付けられた。興味深いことに、口蓋のブラシバイオプシーウエスタンブロッティングでは、4 人全てのドナーで K14 が検出された一方で、K15 と p63 は検出されなかった。これより、基底層の細胞は採取されていないと考えられる。また、ウエスタンブロッティングバンドは K14 と一致する分子量 50 kD を示しており、非特異的な検出ではないと考察された。したがって、口蓋から K14 が検出される原因は特定することができなかった。それでもなお、免疫染色の結果より、K14 は K15 よりもわずかに上層まで発現しており、硬口蓋では上層が剥離しやすい可能性などが考えられたが、原因解明にはさらなる研究が必要である。

以上をまとめると、逆説的ではあるがブラシバイオプシーウエスタンブロッティングは、上層の細胞を低侵襲的に採取し、上層に特徴的なタンパク質発現を解析し得ることが示された(図 2-14)。

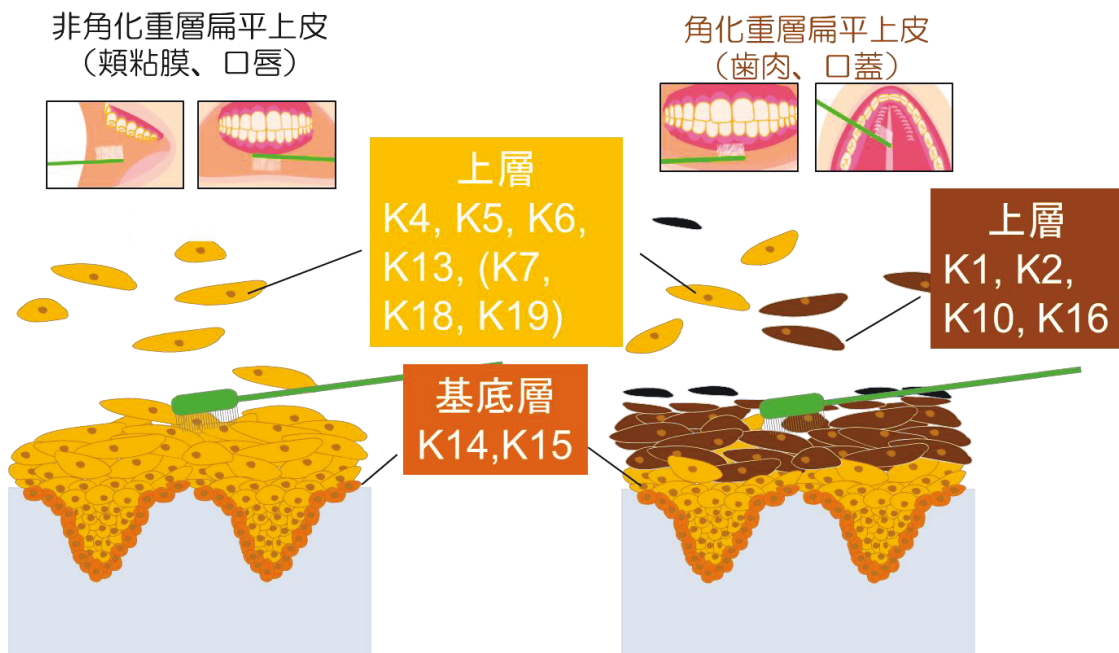


図 2-14. 口腔の各組織においてブラシバイオプシーで採取できる細胞層を示した模式図。ブラシバイオプシーによって上層の細胞を採取することができ、ウエスタンブロッティングによって上層に特異的なタンパク質発現解析が可能であることを明らかにした。【[1](#)より改変・転載】

## 2.4.5 口腔癌検出手法確立への期待

本研究で用いた口腔組織は健常人のものであるが、第一章で論じた通り、白板症や扁平苔癬は口腔上皮の上層では K1、K4、K8、K10、K13、K14、K15、ErbB 受容体 4 の発現が変化する。加えて、カンジダ症では菌に対する  $\alpha$ -defensin 発現する。このため、これら病変患者の組織を用いてマーカータンパク質の発現解析を行うことで、ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングの病変診断の有効性を直接示すことができると期待される（図 2-15）。

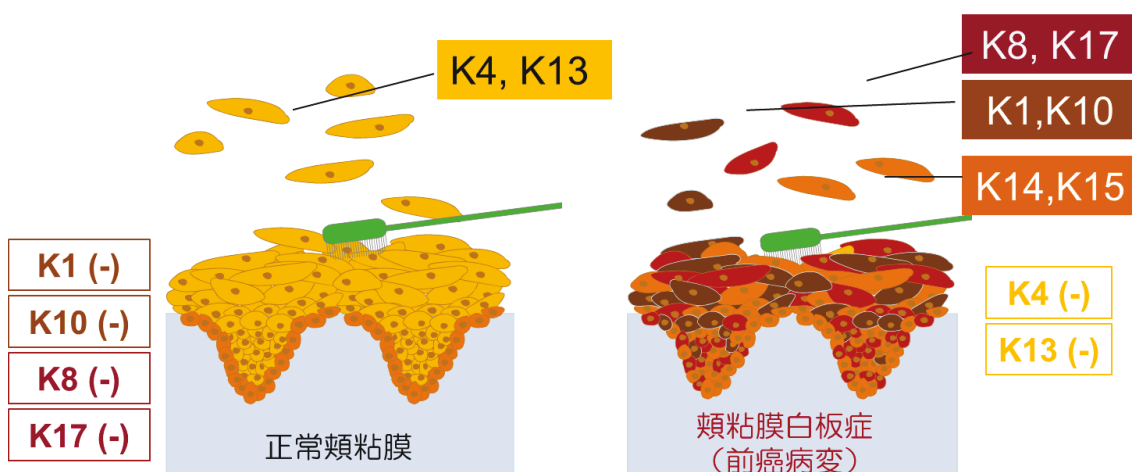


図 2-15. ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングを用いた病変診断への期待。K1、K8、K10、K14、K15、K17 などの発現がブラシバイオプシーウエスタンブロッティングで検出された場合、白板症や扁平苔癬などを患っている可能性が高い。

患者の組織を用いて実験を行う以前に、癌細胞との比較実験を行い、発現の差異を検出できることを示す必要があるため、HO-1-N-1、HSC-2 という 2 つの扁平上皮癌細胞を用いたモデル実験を行った。その結果、K4、K8、K17 において差異があることを確認することができ、口腔の異常を診断するマーカーとなり得ることを示した（図 2-13）。K17 は炎症などに応じて発現が変化するとの報告もあり[5]、炎症を起こした組織を用いての更なる研究が求められる。

癌細胞の種類毎のタンパク質の発現パターンや、正常粘膜と全ての癌・前癌病変の発現パターンは詳細にまとめられていない。さらに、扁平苔癬という一つの病変の括りの中でも様々なケラチンの発現パターンがあることも示されて



いるなど[9]、厳密な確定診断の条件は免疫染色でも確立の途中にある。それでもなお、適切なマーカーを揃えれば、本手法で低侵襲的に口腔病変の診断ができる可能性は示された。

本研究では歯科用の一般的な歯ブラシを用いて実験を行ったが、この他にもスポンジ、綿棒、歯間ブラシ、電動歯ブラシ、そして Oral CDx など様々なブラシを用いた低侵襲的なバイオプシー法がある[16]。採取される細胞は、擦過の力や速さおよび組織の部位などによっても変化し得るため、電動歯ブラシを用いることで、擦過する回転数や圧力などを定量的に設定することが今後の課題である。本研究で用いた歯科用歯ブラシでは K15 陽性の基底層細胞が採取できなかったが、Oral CDx は基底層細胞を採取できるという報告もある[16]。さらに歯間ブラシによって採取した歯肉上皮細胞は培養ができる報告もあり[24]、低侵襲的に口腔粘膜上皮細胞シートを作製する手法にもつながり得る可能性がある。このことから、低侵襲性に留意しながらも歯ブラシや採取法について最適化することも今後重要と考えられた。

また、基底層細胞の性状を確認出来得る Oral CDx と上層に特異的な歯科用歯ブラシを併用することで、患者にとって負担が少ない口腔粘膜上皮の性状解析を進めることができると考えられた(図 2-15)。まず、従来法通りに口腔の性状を目視で観察し、明らかに病変である場合は、ブラシ擦過ですら悪化につながる危険性が考えられるため行わない。しかし、目視では決定できない場合は本研究で行った歯科用歯ブラシを用いたブラシバイオプシーウエスタンブロッティングを行い、複数種類のタンパク質発現解析を行い、本研究の結果と合わせて考察することで、口腔粘膜の性状の情報を多く集められると考えられる。病変の疑いがある場合は、Oral CDx を用いて基底層まで詳細に解析し、最終手段として、口腔粘膜を採取し、免疫染色で確認する。このとき、各段階で十分に考慮する必要があるとともに、いずれのブラシを用いたブラシバイオプシーウエスタンブロッティングについても今後、データを蓄積することが重要である。また、口腔粘膜上皮が細胞シート作製に使用できない場合も考慮し、表皮などの他の部位から作製する細胞シートにおいても、移植治療効果の検証や、目視以外に低侵襲的に事前解析手段を確立することも重要であると考えられる。



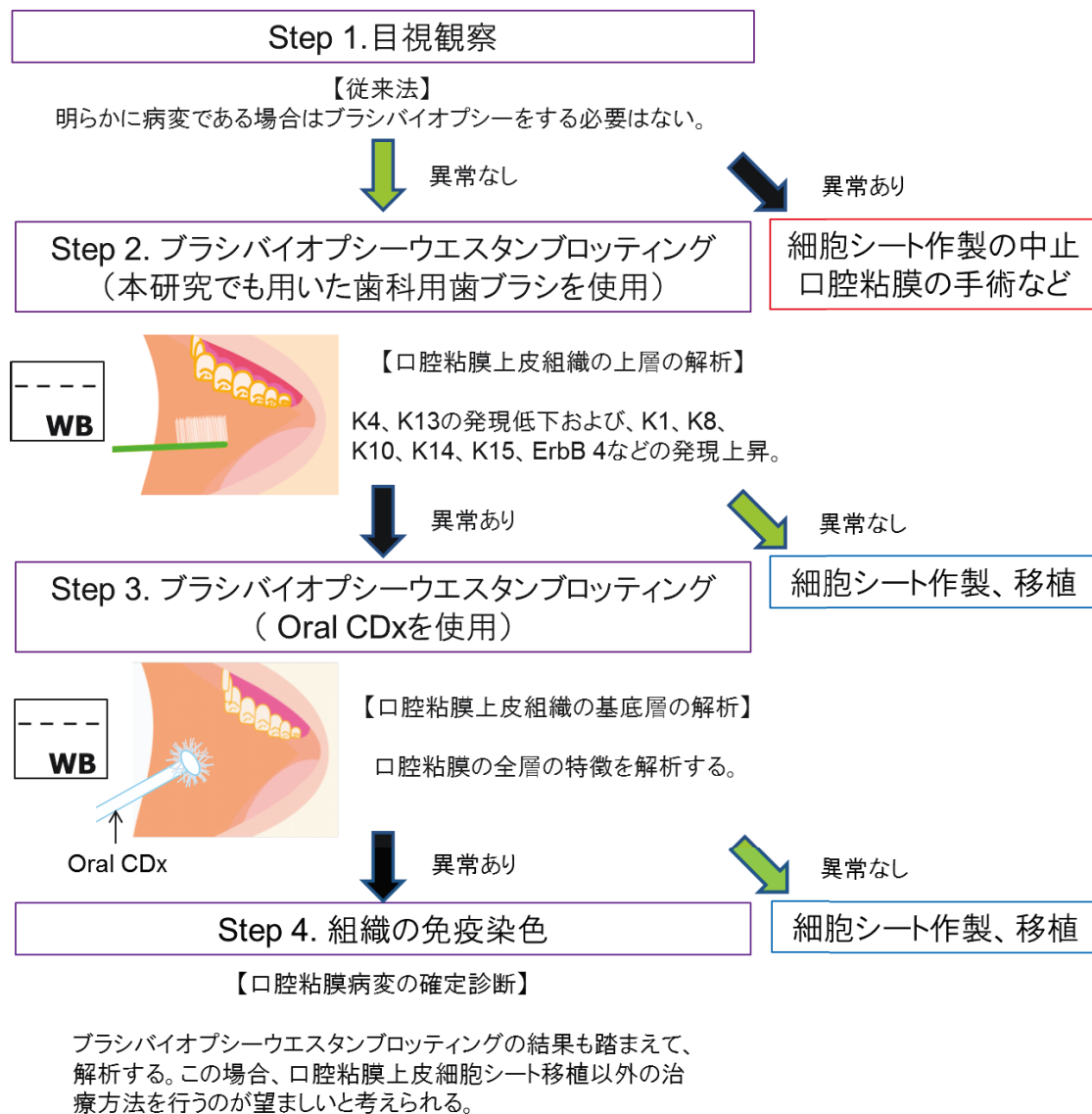


図 2-16. ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングを用いた、口腔粘膜上皮組織検査のフローチャート。【[1](#)】より改変・転載】

## 2.4.6 第二章まとめ

①ヒト口腔粘膜上皮組織の性状を簡便かつ精度よく診断する新たな手法として、ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングを確立した。この際、強固な細胞間結合を持つ上皮組織に対処するため、通常のプロトコルとは異なり **Laemmli sample buffer** を用いたタンパク質抽出の手法など改良を施した。

②ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングは、頬粘膜、歯肉、口唇、口蓋の4か所の正常口腔粘膜の性状を解析し得る手法であることを明らかにした。非角化重層扁平上皮（頬粘膜、口唇）と角化重層扁平上皮（歯肉、口蓋）を解析したところ、それぞれの特性を示すケラチンの発現パターンを検出することができた。

③ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングは重層扁平上皮組織のうち、上層の細胞を採取し、解析する手法であることを示した。

④培養癌細胞を用いたウエスタンブロッティングとの比較によって、癌と正常細胞の差異を示し、病理判別が出来得る可能性を示した。

## **第二章 参考文献**

1. Kasai, Y, Sugiyama, H, Takagi, R, Kondo, M, Owaki, T, Namiki, H, Okano, T, Takeda, N and Yamato, M (2016) Brush biopsy of human oral mucosal epithelial cells as a quality control of the cell source for fabrication of transplantable epithelial cell sheets for regenerative medicine, *Regen Ther* **4**, 71-7.
2. Takagi, R, Yamato, M, Murakami, D, Kondo, M, Ohki, T, Sasaki, R, Nishida, K, Namiki, H, Yamamoto, M and Okano, T (2011) Fabrication and validation of autologous human oral mucosal epithelial cell sheets to prevent stenosis after esophageal endoscopic submucosal dissection, *Pathobiology* **78**, 311-9.
3. Schweizer, J, Bowden, PE, Coulombe, PA, Langbein, L, Lane, EB, Magin, TM, Maltais, L, Omary, MB, Parry, DA, Rogers, MA and Wright, MW (2006) New consensus nomenclature for mammalian keratins, *J Cell Biol* **174**, 169-74.
4. Moll, R, Franke, WW, Schiller, DL, Geiger, B and Krepler, R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, *Cell* **31**, 11-24.
5. Moll, R, Divo, M and Langbein, L (2008) The human keratins: biology and pathology, *Histochem Cell Biol* **129**, 705-33.
6. Presland, RB, Dale, BA (2000) Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease, *Crit Rev Oral Biol Med* **11**, 383-408.
7. Bloor, BK, Seddon, SV and Morgan, PR (2001) Gene expression of differentiation-specific keratins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma, *Oral Oncol* **37**, 251-61.
8. Schaaij-Visser, TB, Bremmer, JF, Braakhuis, BJ, Heck, AJ, Slijper, M, van der Waal, I and Brakenhoff, RH (2010) Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia, *Oral Oncol* **46**, 123-7.
9. Liao, SC, Hsieh, PC, Huang, JS, Hsu, CW and Yuan, K (2012) Aberrant keratinization of reticular oral lichen planus is related to elastolysis, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* **113**, 808-16.

10. Fillies, T, Jogschies, M, Kleinheinz, J, Brandt, B, Joos, U and Buerger, H (2007) Cytokeratin alteration in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma, *Oncol Rep* **18**, 639-43.
11. Jacques, CM, Pereira, AL, Maia, V, Cuzzi, T and Ramos-e-Silva, M (2009) Expression of cytokeratins 10, 13, 14 and 19 in oral lichen planus, *J Oral Sci* **51**, 355-65.
12. van der Velden, LA, Manni, JJ, Ramaekers, FC and Kuijpers, W (1999) Expression of intermediate filament proteins in benign lesions of the oral mucosa, *Eur Arch Otorhinolaryngol* **256**, 514-9.
13. Barakat, SM, Siar, CH (2015) Differential expression of stem cell-like proteins in normal, hyperplastic and dysplastic oral epithelium, *J Appl Oral Sci* **23**, 79-86.
14. Kobayashi, H, Kumagai, K, Gotoh, A, Eguchi, T, Yamada, H, Hamada, Y, Suzuki, S and Suzuki, R (2013) Upregulation of epidermal growth factor receptor 4 in oral leukoplakia, *Int J Oral Sci* **5**, 14-20.
15. Sawaki, K, Mizukawa, N, Yamaai, T, Fukunaga, J and Sugahara, T (2002) Immunohistochemical study on expression of alpha-defensin and beta-defensin-2 in human buccal epithelia with candidiasis, *Oral Dis* **8**, 37-41.
16. Sciubba, JJ (1999) Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group, *J Am Dent Assoc* **130**, 1445-57.
17. Toyoshima, T, Koch, F, Kaemmerer, P, Vairaktaris, E, Al-Nawas, B and Wagner, W (2009) Expression of cytokeratin 17 mRNA in oral squamous cell carcinoma cells obtained by brush biopsy: preliminary results, *J Oral Pathol Med* **38**, 530-4.
18. Eichel, HJ, Conger, N and Chernick, WS (1964) Acid and alkaline ribonucleases of human parotid, submaxillary, and whole saliva, *Arch Biochem Biophys* **107**, 197-208.
19. Driemel, O, Kosmehl, H, Rosenhahn, J, Berndt, A, Reichert, TE, Zardi, L and Dahse, R (2007) Expression analysis of extracellular matrix components in brush biopsies of oral lesions, *Anticancer Res* **27**, 1565-70.

20. Cafiero, C, Matarasso, S (2013) Predictive, preventive, personalised and participatory periodontology: 'the 5Ps age' has already started, *EPMA J* **4**, 16.
21. Squier, CA, Kremer, MJ (2001) Biology of oral mucosa and esophagus, *J Natl Cancer Inst Monogr* **2001**, 7-15.
22. Barrett, AW, Morgan, M, Nwaeze, G, Kramer, G and Berkovitz, BK (2005) The differentiation profile of the epithelium of the human lip, *Arch Oral Biol* **50**, 431-8.
23. Pucci, M, Rapino, C, Di Francesco, A, Dainese, E, D'Addario, C and Maccarrone, M (2013) Epigenetic control of skin differentiation genes by phytocannabinoids, *Br J Pharmacol* **170**, 581-91.
24. Russo, FB, Pignatari, GC, Fernandes, IR, Dias, JL and Beltrao-Braga, PC (2016) Epithelial cells from oral mucosa: How to cultivate them?, *Cytotechnology* **68**, 2105-14.

## 第三章 重層扁平上皮細胞シート接着後の創傷治癒機構解析

Kasai, Y, Takeda, N, Kobayashi, S, Takagi, R and Yamato, M (2017) Cellular events and behaviors after grafting of stratified squamous epithelial cell sheet onto a hydrated collagen gel, *FEBS Open Bio*, DOI: 10.1002/2211-5463.12213. [\[1\]](#)より改変・転載

### 3.1 諸言

#### 3.1.1 本研究の意義

生体組織・臓器の機能や病変の分子機構が分子生物学的に理解され、培養技術も進歩したことによって、自家の培養細胞を用いた移植治療が考案されてきた。この治療方針の決定や治療効果の向上を達成し、治療方法として確立するためには、移植後の細胞の挙動を分子レベルで理解することが上で非常に重要である。

第一章に記載した通り、食道粘膜癌の内視鏡的切除の合併症である狭窄の防止と創傷治癒の促進において、自家口腔上皮細胞シートの移植は極めて有効であり高い治療成績を収めている。しかし、細胞シート移植後の治癒の詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。

分子機構解明の研究を行う上で、動物モデル実験で用いるマウスやラットの食道は大変狭く、モデルの作製および細胞シートの移植実験は困難を要する。加えて、ブタモデルでは詳細な解析に必要な抗体やゲノムDNA情報が多くない。他方、ヒトでは全ゲノムの解明により詳細な解析が出来得る一方で、治癒過程の分子機構の解析を行うには、患者へ折角移植した治療途中の組織を経時的に採取して、タンパク質発現解析や遺伝子発現解析などをする必要があり、これらは患者の治療を第一に考えると現実的ではない。

このため、重層扁平上皮細胞シートの接着後の挙動を解析するには、ヒトサンプルを用いつつ、*in vitro* 実験で細胞シート接着後の経時的な挙動を詳細に理解することが重要と考えられた。したがって、本研究では、*in vitro* のシンプルな実験系を確立することからはじめ、続いて細胞シート接着後の挙動について経時的な解析を行った。

### 3.1.2 上皮細胞の動的挙動に関する既存研究

上皮細胞は単一細胞レベルで、接着や遊走挙動が詳細に研究されてきた。細胞と基質の接着では、インテグリンが細胞外マトリックスタンパク質と結合し、細胞内にシグナルを伝達して接着斑を形成する。さらにアクチンフィラメントの重合化とインテグリンのさらなる集積がなされ、接着依存細胞である上皮細胞はアノイキスから免れることができる。接着した上皮細胞の内部では、アクチンに結合するミオシンがリン酸化を受けてアクトミオシンとして働き、細胞は遊走する[2, 3]。

また、重層扁平上皮細胞は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で培養すると、カドヘリンによる細胞間接着が形成されて上皮の極性化が誘導され、コンフルエント後から重層化する[4]。一方で、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低い条件下ではカドヘリンによる細胞間接着が形成されず、間葉系様の性質を示すことが知られている[5]。また、上皮細胞の創傷治癒機構や集団的遊走挙動を調べるスクラッチアッセイという研究も行われてきた[6]。

### 3.1.3 *In vitro* モデル系を用いた接着後の上皮細胞シートの挙動解析

本博士研究では、多数の細胞から成る重層扁平上皮細胞シートを対象として研究を進める。表皮細胞と口腔粘膜上皮は共に重層扁平上皮に分類され、角化層以外のタンパク質発現パターンは近いとされている（第一章）。第一章で述べた細胞シート移植の臨床研究で細胞ソースとした口腔粘膜は面積が狭く上皮細胞の採取量に限度があることから、より広範囲にわたって細胞採取ができる表皮も細胞ソースとして期待され、表皮細胞シートを食道へ移植する研究も進められている[7]。そこで、市販品として入手しやすいヒト表皮角化細胞（Normal human epidermal keratinocytes, NHEK）細胞を用いて細胞シートを作製し、実験を行った。

本研究ではまず、NHEK 細胞シートの移植に伴う動的な挙動を分子レベルで正確に解析ができる *in vitro* モデルを確立し、接着後の運動を経時的に観察すると共に、接着前および接着後のいくつかの時点でのタンパク質ならびに遺伝子の発現パターンを免疫染色および定量 PCR によって詳細に解析した。*In vitro* モ

デルの確立において、細胞シートを貼付する基材は生体で細胞が接着している基質に類似していることが望ましい。ただし、食道癌切除後に露出する結合組織は、I 型コラーゲンを基盤に線維芽細胞、血管内皮細胞、血栓（フィブリン）など多くの構成要素が存在し、組み合わせによっては無数の因子となる。多くの因子との相互作用に注目する以前に、接着後の細胞シートの基本的な挙動を解析することを第一目標として取り組むために、I 型コラーゲンハイドロゲルを主たる接着用基材として用いて本研究を進めた。



## **3.2 材料と方法**

### **3.2.1 材料**

#### **3.2.1.1 実験サンプル**

- ・ヒト皮膚ケラチノサイト, 新生児 (Normal Human Epidermal Keratinocyte-Neonatal, NHEK; 00192907, Lonza)
- ・ヒト皮膚線維芽細胞, 新生児 (Normal Human Dermal Fibroblasts-Neonatal, NHDF; CC-2509, Lonza)

#### **3.2.1.2 試薬**

培養に使用した試薬

- ・KGM-Gold (00192152, Lonza)
- ・DMEM (D6429, Sigma-aldrich)
- ・Nutrient mixture F-12 Ham (F-12; N4888, Sigma-aldrich)
- ・Penicillin streptomycin (PS; 15140, Gibco)
- ・FBS (S1650-500, Japan bioserum)
- ・セルバンカー (CB011, 日本全薬工業)
- ・トリプシン EDTA (T4174, Sigma-aldrich)
- ・トリプシンインヒビター (CC-5002, Lonza)
- ・0.4 % トリパンプブルー溶液 (T8154, Sigma-aldrich)
- ・ハイドロコルチゾン (080-05581, 和光純薬工業)
- ・トリヨードチロシン (592-12121, 和光純薬工業)
- ・コレラトキシン (030-16331, 和光純薬工業)
- ・インスリン (41400-045, Gibco)
- ・トランスフェリン (11107-018, Gibco)
- ・EGF (13247-051, Invitrogen)
- ・I型コラーゲングル (Typr I-A, 新田ゼラチン)

- Imatinib (SML1027, Sigma-aldrich)
- SB216763 (ab120202, Abcam)
- Platelet-derived growth factor receptortyrosine kinase inhibitor III (PDGF RKI; sc-204173, Santa cruz)
- TGF- $\beta$ 1 receptor kinase inhibitor (TGF- $\beta$ 1 RKI; 616451, Calbiochem)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (047-29353, 和光純薬工業)

定量 PCR に使用した試薬

- RNA 抽出キット (RNeasy Plus Mini Kit; 74134, Qiagen)
- First strand cDNA Synthesis (NP100041, Origene)
- TaqMan fast advanced master mix (4444557, Applied biosystems)
- 6-FAM dye-labeled TaqMan prove (Applied biosystems) 以下詳細  
*GAPDH*: Hs99999905\_m1, *VIM*: Hs00185584\_m1, *CDH2*: Hs00983056\_m1, *FNI*:  
Hs00365058\_m1, *TWIST1*: Hs00361186\_m1, *CDH1*: Hs00170423\_m1, *COL17A1*:  
Hs00990036\_m1, *MKI67*: Hs01032443\_m1, *TP63*: Hs00978339\_m1, *FLG*:  
Hs00856927\_g1

### 3.2.1.3 使用器具・機器

- 6 ウェルプレート (353502, Falcon)
- 温度応答性インサート (セルシード)
- スカルペル No.14 (219AABZX00136000, フェザー安全剃刀)
- シェーカー (Shake-XR, Taitec)
- パラフィン包埋機 (Tissue-Tek VIP, Sakura finetek)
- パラフィンブロック作製機 (EG1150 H, EG1150 C, Leica)
- 逆転写装置 (iCycler, Biorad)
- PCR 装置 (7500 Real Time PCR System, Applied biosystems)
- タイムラプス顕微鏡 (Eclipse Ti, Nikon)
- ステージインキュベーター (GM-8000, 東海ヒット)

### 3.2.1.4 第三章で使した抗体一覧

表 3-1. 抗体一覧

抗体名	クローン	免疫染色 希釈濃度	カタログナンバーと会社名
Pan-cytokeratin	AE1/AE3	1/100	ab27988, Abcam
E-cadherin	NCH-38	1/100	M3612, Dako
$\beta$ -catenin	$\beta$ -catenin	1/100	M3539, Dako
Type I collagen	-	1/400	ab34710, Abcam
Integrin $\beta$ 1	-	1/100-200	4706, Cell signaling
Integrin $\beta$ 4	-	1/200	4707, Cell signaling
Integrin $\alpha$ 2	EPR5788	1/400	ab133557, Abcam
Integrin $\alpha$ 5	-	1/400-500	4705, Cell signaling
Type XVII collagen	NC16A-3	1/30	ab79878, Abcam
Laminin 5	-	1/100	ab14509, Abcam
Ki67	MIB-1	1/100	M7240, Dako
p63	4A4	1/50	sc-8431, Santa cruz
Phospho-myosin light chain 2 (Thr 18/Ser 19)	-	1/50	3674, Cell signaling
Keratin 1	34 $\beta$ B4	1/100	NCL-CK1, Leica
Filaggrin	FLG01	1/100	MA5-13440, Thermo fisher science
N-cadherin	D4R1H	1/100	13116, Cell signaling
Vimentin	V9	1/50	M0725, Dako

【[1](#)】より改変・転載】

## 3.2.2 試薬の準備（調製）と手技・方法

### 3.2.2.1 KCM の調製

GMP を準拠した試薬ではないが、既報と同様の培地（Keratinocyte Culture Medium, KCM）を調製した[5, 8]。KCM は商品として販売されていないため、実験毎に以下の通りに調製し、2 カ月以内に使用した。まず、基礎培地 DMEM と F-12 を 3:1 の割合で混合し、ここに、1% PS、5% FBS、ハイドロコルチゾン 0.4  $\mu\text{g/mL}$ 、トリヨードチロニン 2 nM、コレラトキシシン 1 nM、インスリン 5  $\mu\text{g/mL}$ 、トランスフェリン 5  $\mu\text{g/mL}$ 、EGF 10 ng/mL の濃度で添加した。

### 3.2.2.2 培養基材の作製

これまでの前臨床および臨床研究において、上皮細胞シートは主に粘膜上皮を除去した結合組織に移植されてきた。結合組織は I 型コラーゲンに富み、水分を多く含む組織である。このことから I 型コラーゲンを培養基材として用いた。購入先である新田ゼラチンが推奨している手法に沿ってコラーゲン溶液を作製し、35 mm 培養皿一枚につき 2 mL ずつ注ぎ、37°C で 30 分以上インキュベートしてゲル化させた。ゲル内にフィーダー細胞を添加する実験の場合 (3.3.6)、過去の上皮様組織作製の報告を参考にし、ヒト線維芽細胞 (Normal human dermal fibroblast, NHDF) 細胞、マウス線維芽細胞 (3T3)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)、ヒト大動脈平滑筋細胞 (Aortic smooth muscle cells, AoSMC) を  $1 \times 10^5$  viable cells/mL の濃度で包埋させた[9]。また、NHDF : AoSMC : HUVEC : ヒト骨格筋芽細胞 (Human skeletal muscle myoblasts, HSMM) を 1 : 1 : 1 : 1 で混合して包埋させたコラーゲングルも作製した (Mix)。

### 3.2.2.3 阻害剤

Imatinib、SB216763、PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor III (PDGF RKI)、TGF- $\beta$ 1 receptor kinase inhibitor (TGF- $\beta$ 1 RKI) は DMSO に溶かし、それぞれ、10

mM、5 mM、10 mg/mL、3.7 mM の濃度で保存し、最終濃度をそれぞれ、10  $\mu$ M[10]、10  $\mu$ M[11]、30  $\mu$ M[12]、1  $\mu$ M[13]になるように KCM に添加した。

#### 3.2.2.4 NHEK 細胞シートの作製と培養

上皮細胞シートの作製は確立された方法に沿って行った。購入した細胞で多くの実験を行うため、まず継代によって細胞を増やした後、凍結保存を行った。NHEK は株細胞として確立されていない初代細胞であるため、Lot. によってその性状が異なっている。このため、細胞生存率、接着率、倍加時間、人種を予め問い合わせた後に、特に接着率が 80%以上の細胞を購入した。

NHEK 細胞を 3000–5000 cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、KGM-Gold を用いて、3–4 日間培養した。サブコンフルエントまで増殖した細胞をトリプシン EDTA によって剥離回収し、トリプシンインヒビターで反応を停止させた。セルバンカー溶液に  $1 \times 10^6$  cells/mL の濃度で分注し、-80°C で 1 日以上凍結させた後、-190°C で保存した。なお、継代数が 2 を超えるあるいは 2 回以上凍結保存処理を行うと細胞シートが作製できない場合があったことから、継代数は 1 あるいは 2 とした。

まず、温度応答性インサートを 6 ウェルプレートに取り付け、3.2.2.1 で調製した KCM を、6 ウェルプレートに 2.5 mL と温度応答性インサートに 1.5 mL 加えた。トリパンブルーアッセイで細胞の生存率を確認した後、インサート上に NHEK の生細胞を  $3-4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、細胞が均一に播かれていることを位相差顕微鏡で確認した後、37°C で培養を開始した。サブコンフルエントで一度培地交換を行い、コンフルエント後は毎日培地交換を行った。細胞は 4–6 日の間でコンフルエントに達し、9 あるいは 10 日目に細胞シートとして剥離回収し、続いてゲルへの接着実験を行った。

#### 3.2.2.5 NHEK 細胞シートの接着挙動アッセイ

前節の条件で 9–10 日間培養した NHEK 細胞を 20°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 30 分インキュベートさせた後、ピンセットを用いて温度応答性インサートから細胞シートを剥離した。剥離後の細胞シートを乗せたままスカルペルを用い

インサートメンブレンを切り抜き、このメンブレンを支持体としてコラーゲンゲルへ移動させた（図 3-1）。細胞シートをコラーゲンゲルのおよそ中心に静置させた後にこの支持体を取り除き、ここまでの操作で寄りが生じてしまった細胞シートをピンセットやピペット操作によって完全に広げた。続いて細胞シートの接着を確実にするためにナイロンメッシュで覆った約 0.6 g のシリコンシートのおもりをのせて 37℃でインキュベートし、1 時間後にシリコンシートを除去して KCM を 2 mL 加えた。物理的な刺激に耐えうる接着がなされたかどうかを評価するために、実験毎に 1 枚の接着後の細胞シートを、20 mm の幅で 8 の字を描くシェーカーの上に乗せ、100 回転/分の速度で 30 秒間揺らし、細胞シートがゲルから剥離しないかを確認した。接着させた日を 0 日目とし、以後 2 日毎に KCM の培地交換を行い、最長 21 日間にわたり培養を行った（図 3-1）。

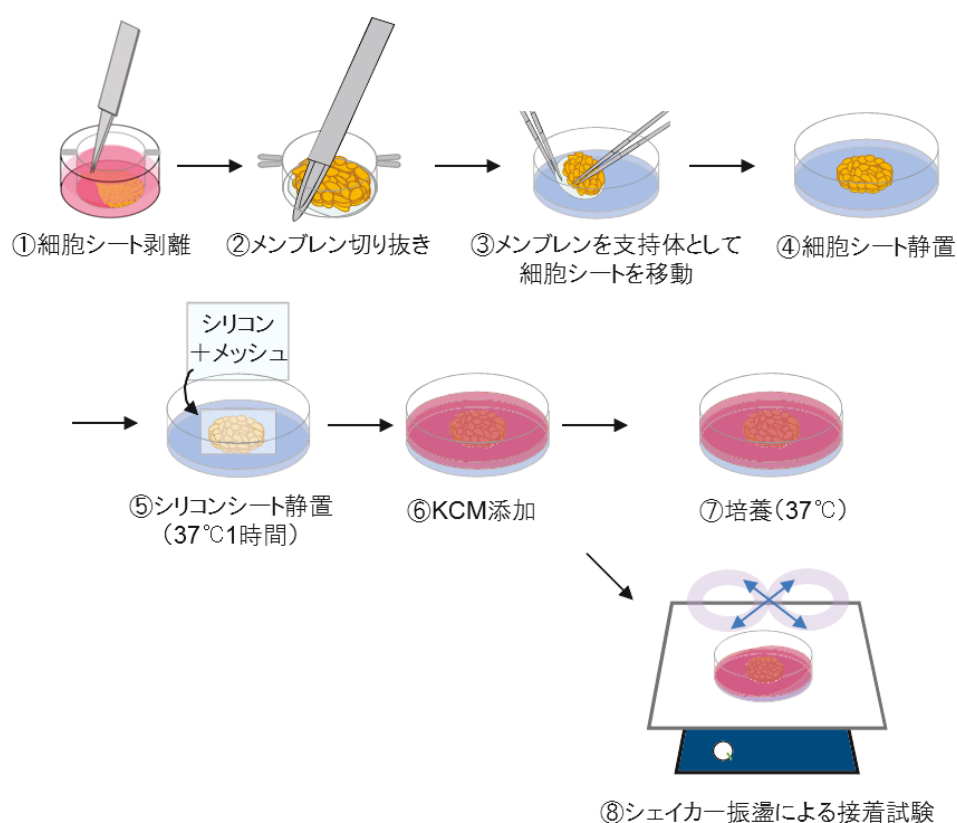


図 3-1. 細胞シート接着アッセイの実験方法。作製した NHEK 細胞シートの基底面側をコラーゲンゲルに移植する。メッシュで覆ったシリコンシートを 1 時間乗せて接着させる。その後、KCM を 2 mL 添加して培養する。【[1]より改変・転載】

### 3.2.2.6 細胞シートのパラフィン包埋ブロックおよびパラフィン切片

#### 作製

接着実験を終えた細胞シートはゲルと接着を維持したまま培養皿から回収することができた。これより、免疫染色による細胞シートの断面の解析が可能となり、このためのパラフィンプロック作製方法を以下に記載する。

剥離直後の細胞シートや、接着後の細胞シートを PBS で 2 回洗浄した後に、4% PFA にプロテアーゼ・ホスファターゼインヒビターを加えた固定溶液を滴下し、4℃で 1 晩以上固定した。過固定を避けるため、PFA 固定期間は 2 週間以内とした。PFA 固定後のサンプルは、水道水で 1-3 時間洗浄した後に、70%、80%、90%、100%エタノールに各 1 時間浸して脱水した。この後、パラフィン包埋機を用いて 100%エタノールに 4 回、キシレンに 4 回、液体パラフィン（60℃）に 2 回をそれぞれ 1 時間間隔で処理し、サンプルをパラフィンで置換した。この後、ステンレストレーに細胞シートを直立させた後、-5℃のプレートで急冷させてパラフィンプロックを作製した。

切片試料の作製ならびに免疫染色の実験は第二章の 2.2.2.6 のプロトコルに従って実施した。

### 3.2.2.7 IHC Profiler による免疫染色結果の定量化

免疫染色の結果を定量化するために、ImageJ プラグインの一つである IHC Profiler を用いた。この IHC Profiler は、対象画像の DAB 染色の強さを、自動的に High positive (HP)、Positive (P)、Low Positive (LP)、Negative (N) の 4 つのレベルに分類して、この割合をパーセンテージで表すことができる[14]。さらに、この領域の割合のバランスから独自のアルゴリズムに基づいて発現の最終的な強度を 4 段階のいずれかに決定する。免疫染色において、発現の強弱を論じる場合には、この IHC Profiler を用いて解析した。

### 3.2.2.8 NHEK 細胞シート接着による核の角度の測定

パラフィン切片の各試料について 15 枚ずつの切片(切片の間隔は 20  $\mu\text{m}$  以上)にヘマトキシリン・エオシン (Hematoxylin-eosin, HE) 染色を施し、核の角度を測定した ( $n=5$ 、測定した核の合計 1032 個)。移植後の細胞シートにおいては、ゲルに接着している細胞シートの基底部の細胞に注目して計測した。

### 3.2.2.9 NHEK 細胞シート接着後の増殖測定

パラフィン切片の各試料について 15 枚ずつの切片(切片の間隔は 20  $\mu\text{m}$  以上)に Ki67 の免疫染色を施し、切片 1 枚あたりの陽性細胞の数を測定した ( $n=5$ )

### 3.2.2.10 遺伝子発現解析

ゲル上での細胞シートの培養が終了した後に、培養皿から培地を除去し、PBS で洗浄した。続いて細胞シート 1 枚から RNA 抽出キットを用いて Total RNA を抽出した[5]。回収した Total RNA から逆転写をして cDNA を作製し、TaqMan プローブおよび DNA 合成酵素を用いて定量 PCR を行った。インターナルコントロールとして GAPDH を用い、定量的解析を行った。

### 3.2.2.11 粒子イメージ流速計測法 (Particle image velocimetry, PIV) による NHEK 細胞シート遊走挙動の定量解析

ImageJ プラグインの粒子イメージ流速計測法 (Particle image velocimetry, PIV) を用いて、タイムラプス観察画像の連続した 2 枚の写真から pixel の変化を読み込み、細胞シートの遊走挙動を解析した。顕微鏡画像における単位長あたりの pixel 数を測定した後 (ImageJ, Set scale)、細胞が直線的に移動したとの仮定の下で、移動した pixel の数から遊走速度の計算を行った。



(例)

一つの細胞が、30 分間隔で撮影したタイムラプス画像の 2 枚の写真間で 10 pixel 移動したとする。また、pixel あたりの長さは pixel/micron で表示され、例えば 0.5 [pixel/micron] とすると、

$$10 \text{ [pixel]} \div 0.5 \text{ [pixel/micron]} = 20 \text{ }\mu\text{m}$$

30 分間隔 (0.5 h) で撮影したサンプルなので、遊走速度は

$$20 \div 0.5 = 40 \text{ [}\mu\text{m/h]} \quad \text{と見積もられる。}$$

### 3.3 実験結果

#### 3.3.1 上皮細胞シートのタンパク質発現パターン解析

温度応答性培養皿で培養する細胞は 20℃へ温度を低下させるだけで自発的に剥離するものが多いが、培養した上皮細胞は接着力が強く、低温処理により器材との接着は弱まるが自発的には剥離しない細胞であった。このため、温度応答性インサートでコンフルエントまで培養した上皮細胞はピンセットを用いて器材から剥離し、重層扁平上皮細胞シートとして回収した。ピンセットでつかんでも破損することはほとんどなく、基質との結合よりも細胞間結合が強いことが推察された。この細胞シートについて、ゲルに接着する前の遊離の状態における 16 種類のタンパク質の発現パターンを、免疫染色によって解析した（図 3-2）。このとき、抗体が正確に機能するかを確認するため、ポジティブコントロールとしてヒト口腔粘膜組織ならびにヒト食道組織の免疫染色も行った。（図 3-3）。

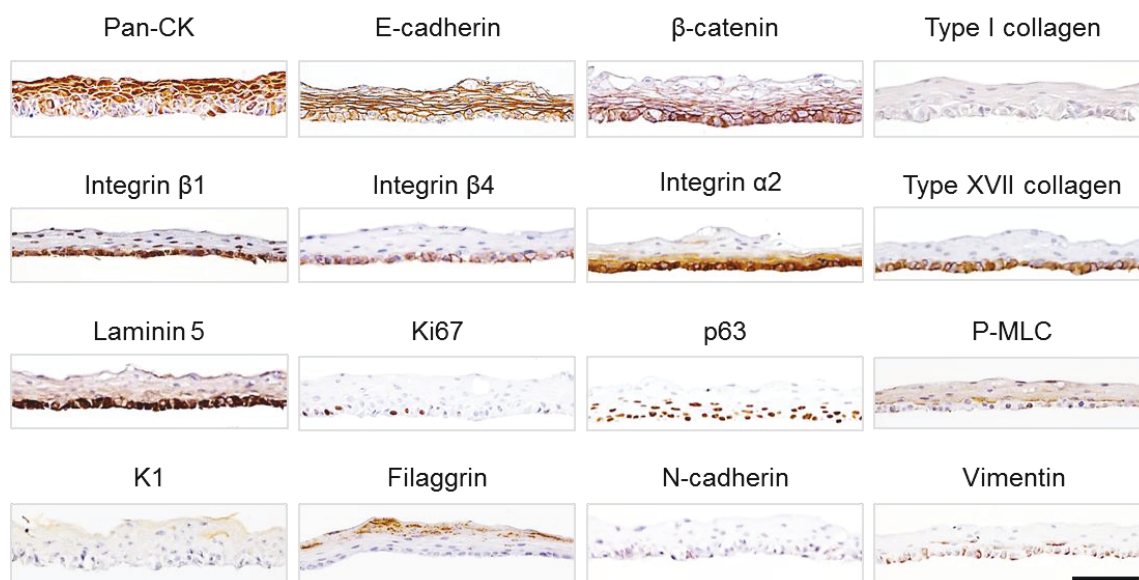


図 3-2. 温度応答性インサートから剥離回収した遊離の NHEK 細胞シートにおけるタンパク質発現パターンを示す免疫染色像。スケールバー：100 μm。【[1]より改変・転載】

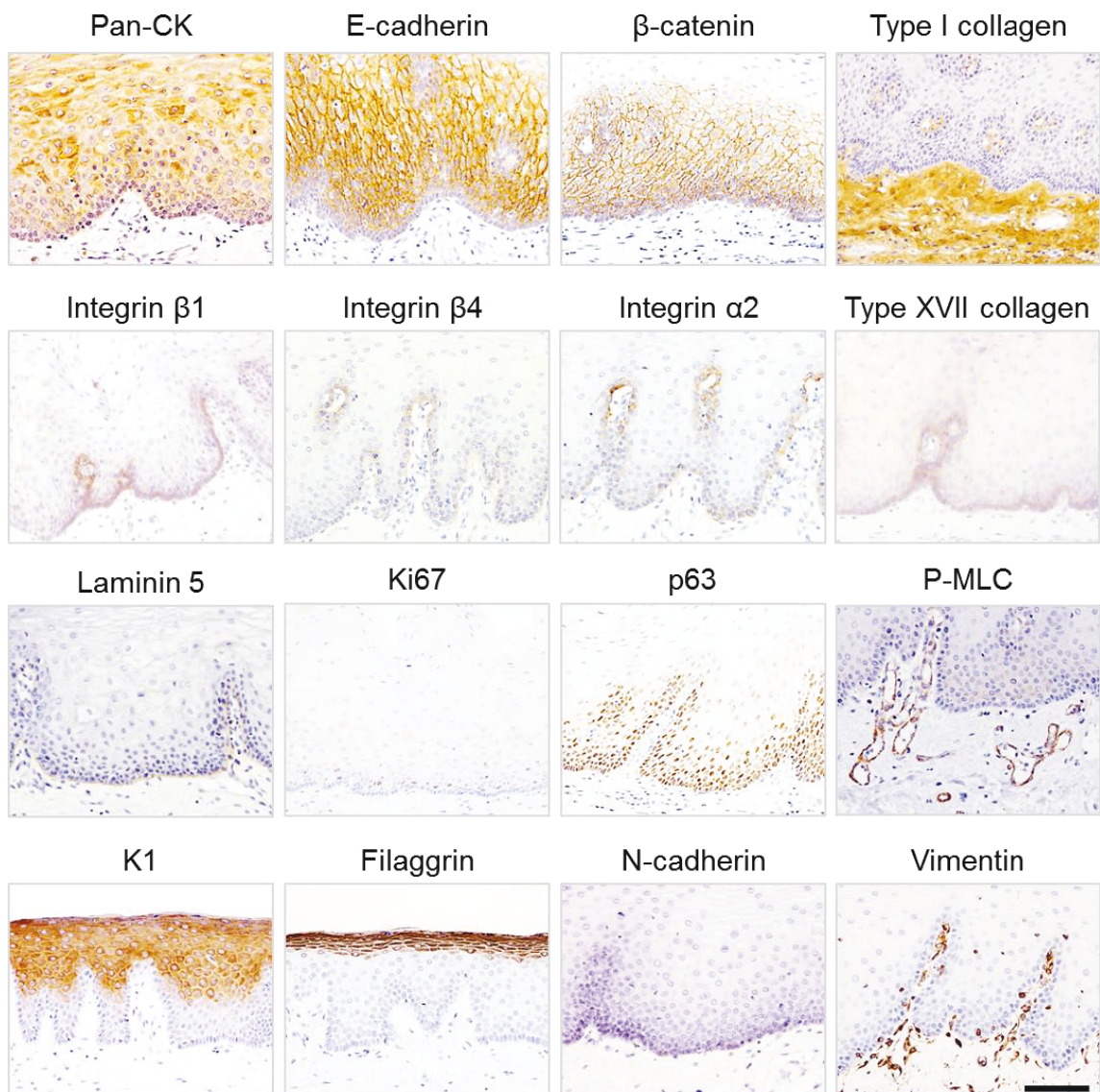


図 3-3. 正常ヒト粘膜上皮組織におけるタンパク質発現パターンを示す免疫染色像。スケールバー：100  $\mu\text{m}$ 。【[1](#)】より改変・転載】

作製した上皮細胞シートを組織学的に解析すると、一様に約 6-10 層重なり、およそ 100  $\mu\text{m}$  の厚みがあった。基底層の細胞は立方体様の形状である一方で、上層の細胞は扁平な形状を示したことから、上皮細胞シートは重層扁平上皮組織の構造に類似していることが確認された（図 3-2）。

免疫染色結果においても重層扁平上皮の性質を示す複数種類のマーカーが陽性であった。まず、Keratin 1-8、10、12、14、16、19 といったほとんどの上皮細胞のケラチンを認識する抗体である Pan-cytokeratin を用いた免疫染色の実験では、上皮細胞シートならびに上皮組織のすべての細胞の細胞質が陽性であっ

た。E-cadherin は接着結合やデスモソーム結合といった上皮の細胞-細胞間接着に関与するタンパク質であり、上皮細胞シートの免疫染色では細胞一つ一つを取り囲むような染色パターンを示した。 $\beta$ -catenin は E-cadherin の細胞内裏打ちタンパク質であるとともに、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路では重要な核内転写因子の一つとして知られるが、免疫染色の結果、細胞シートおよびヒト上皮組織試料で細胞間接着に寄与している発現パターンを示した。Type I collagen は線維芽細胞などから生成され、生体で約 30%を占める主要な細胞外マトリックスタンパク質として知られる。したがって、上皮細胞シートならびにヒト上皮組織試料には発現が見られず、Type I collagen は上皮細胞培養の間に生成されないことが示された。一方で、コントロールのヒト粘膜上皮組織の結合組織部位から発現が検出され、免疫染色が正確に機能していることは明らかであった。Laminin 5 は上皮細胞シートでは基底細胞の全体的に発現が観察されたが、ヒト組織試料では上皮組織と結合組織をつなぐ基底膜タンパク質に発現が見られ、わずかに差異があった。数種の Integrin と Type XVII collagen は細胞シートの基底細胞の基底表面ならびに細胞間に発現していた。これらの基底層に発現するタンパク質は、温度応答性インサートから剥離回収後も温存されていたことも確認した。Ki67 と p63 は、上皮細胞シートの基底側の核内で発現が見られ、細胞の増殖能や未分化性が維持されていることが示唆された。最も大きい分子量ケラチンで高い強度をもつ K1 ならびに、この K1 を架橋し細胞の強度を補強する Filaggrin は、培養 10 日で作製した細胞シートの上層でわずかに発現しており、終末分化にまで近づいていた細胞の存在が示唆された。アクチンと複合体を形成し、アクトミオシンとして細胞の動的挙動を制御する P-MLC は、上皮細胞シートとして剥離すると基底層での発現は低下するが、上層での発現は維持されており、細胞シートの動的挙動に関与すると考えられた。Vimentin は細胞シートの基底層ならびに結合組織に存在する線維芽細胞に発現が見られた。(図 3-2、図 3-3)。これらの発現パターンは上層と基底層に分けて、IHC Profilar によって定量化し、表 3-2 に記載した。

表 3-2. IHC Profiler による剥離後 NHEK 細胞シートの免疫染色結果の定量化。

抗体名	上層				基底層			
	HP	P	LP	N	HP	P	LP	N
Pan-cytokeratin	<b>52.0</b>	17.3	17.4	13.3	37.6	<b>9.1</b>	15.6	37.3
E-cadherin	37.8	<b>19.0</b>	16.8	26.3	28.8	<b>17.1</b>	20.8	33.2
$\beta$ -catenin	19.3	<b>28.4</b>	27.8	24.6	1.9	9.7	<b>40.4</b>	48.1
N-cadherin	0.0	0.0	2.2	<b>97.8</b>	0.0	0.5	8.8	<b>90.7</b>
Vimentin	1.3	7.1	22.1	<b>69.5</b>	19.6	<b>18.7</b>	21.2	40.5
Type I collagen	0.0	0.0	0.0	<b>100.0</b>	0.0	0.0	1.8	<b>98.2</b>
Integrin $\beta$ 1	1.0	3.9	8.6	<b>86.5</b>	18.2	<b>19.8</b>	14.1	47.9
Integrin $\beta$ 4	0.0	1.6	15.5	<b>82.8</b>	10.3	<b>17.9</b>	30.5	41.4
Integrin $\alpha$ 2	0.6	5.1	16.8	<b>77.5</b>	<b>64.9</b>	22.0	8.3	4.9
Type XVII collagen	0.2	2.9	9.2	<b>87.7</b>	<b>63.5</b>	24.2	6.9	5.4
Laminin 5	0.0	1.2	24.4	<b>74.3</b>	40.7	<b>17.1</b>	28.4	13.8
K1	0.1	0.3	3.4	<b>96.3</b>	0.0	0.0	1.6	<b>98.4</b>
Filaggrin	7.2	11.0	<b>23.1</b>	58.8	1.3	2.1	3.7	<b>93.0</b>
Ki67	0.0	0.0	0.0	<b>100.0</b>	19.6	<b>13.2</b>	19.9	47.2
p63	25.7	<b>13.0</b>	20.1	41.2	29.7	<b>19.1</b>	19.6	31.6
Phospho-myosin light chain 2 (Thr 18/Ser 19)	1.1	9.6	<b>57.1</b>	32.2	1.5	4.2	10.4	<b>83.9</b>

HP: High Positive、P: Positive、LP: Low Positive、N: Negative。最終的な発現の強さを白抜きで記載した。【[1](#)】より改変・転載】

このように NHEK 細胞シートは、生体組織よりは薄いものの、上皮に特徴的な基底層と上層での異なる細胞形状が認められ、タンパク質発現パターンも上皮組織特有の極性を示すことが確認された。

### 3.3.2 NHEK 細胞シート接着アッセイ

続いて、NHEK 細胞シートの接着による動的な挙動変化を解析する *in vitro* モデル系を検討した。培養基材には 3.2.2.2 で述べた I 型コラーゲンゲルを用いた。まず、細胞シートがゲルに接着するのに要する十分な時間を検討した。細胞シートの基底面をコラーゲンゲルに静置した後、ナイロンメッシュをかぶせた約 0.6 g のシリコンのおもりを載せて 37°C でインキュベーションする時間を変化さ



せた。インキュベーション時間が 5 分以内では、ホルマリン固定をしてそれに続くパラフィンブロックにする過程で細胞シートはゲルから剥離してしまったが、インキュベーション時間 10 分以上に延長すると、パラフィンブロック作製を経て HE 染色を行っても細胞シートとゲルは十分に接着を保ち両者の界面を観察できた (図 3-4)。インキュベーション時間が 10 分では細胞シートとゲルの間に隙間が観察されたが、インキュベーション時間が 60 分以上でほとんど隙間がなくなっていた。後述する増殖能や細胞遊走の解析から、細胞シートの細胞生存率は 60 分間の加重でも影響がみられなかった。これより以後は、インキュベーション時間を 60 分に固定した。

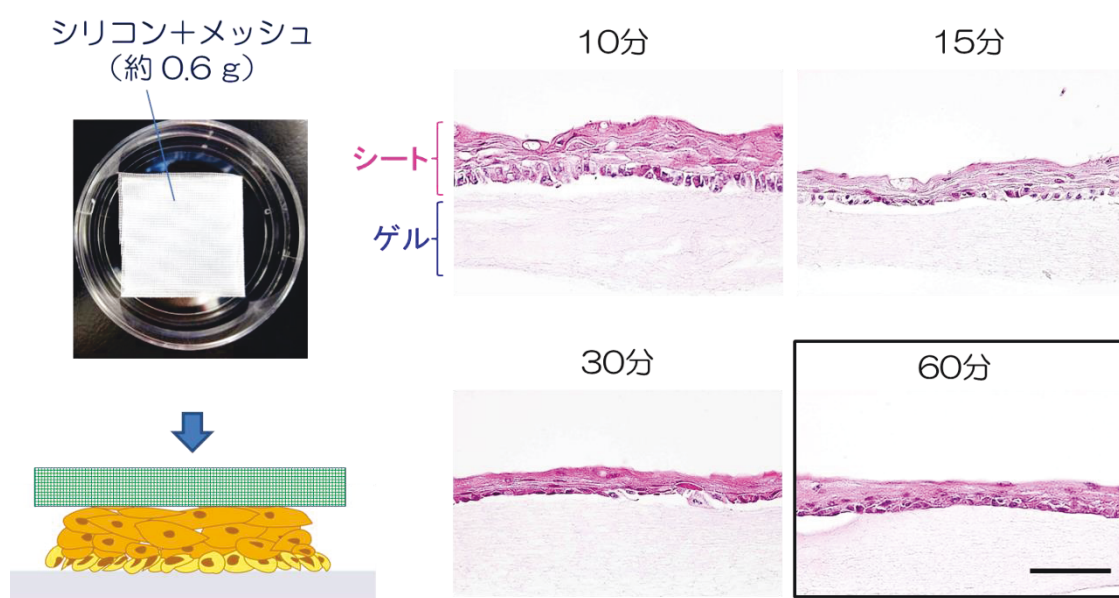


図 3-4. HE 染色による細胞シートのコラーゲンゲルへの接着評価。シリコンシート載せる加重時間を変化させた。インキュベーション時間 60 分で確実な接着が観察された。スケールバー：100 μm。【[1](#)】より改変・転載】

コラーゲンゲルへの接着を成功させるには細胞シートの表裏の向きが重要であり、NHEK 細胞シートの基底面を I 型コラーゲンゲルに静置させると 90%以上の成功率でシェーカーの刺激に耐えうる接着がなされると共に、隙間がほとんどなく一様に接着していたことが接着 1 日後の Type I collagen の免疫染色結果から観察することができた (図 3-5)。

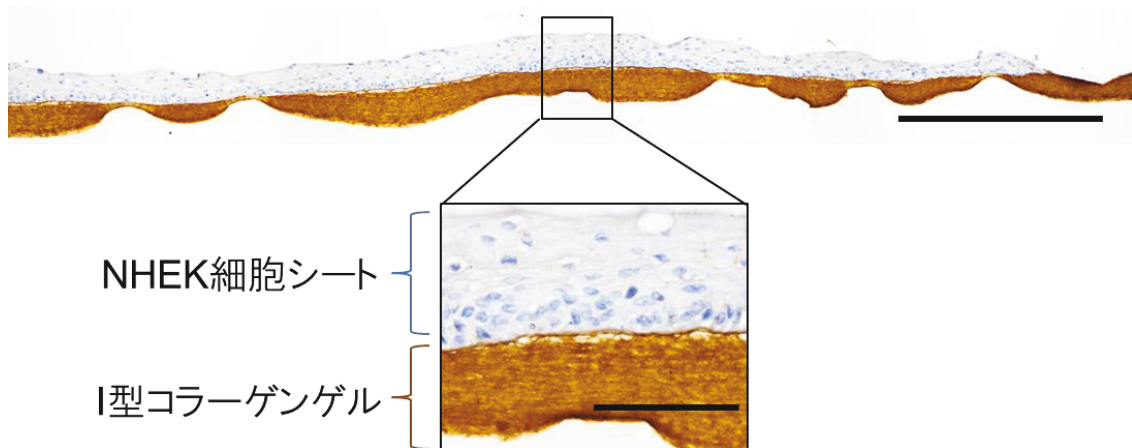


図 3-5. 免疫染色による細胞シート接着評価。I 型コラーゲンゲルへ接着させて 1 日後の細胞シートの断面を Type I collagen 免疫染色で確認した。スケールバー：500  $\mu\text{m}$  (上図)、100  $\mu\text{m}$  (拡大図)。【[1](#)]より改変・転載】

一方で、細胞シートを反転させて、表層面をゲルに静置しても全く接着できなかった ( $n=2$ , 図 3-6)。したがって、細胞シートの基底層に発現するインテグリンや Laminin 5 を始めとした接着タンパク質が、細胞シート接着に重要な役割を果たしていることが示された。

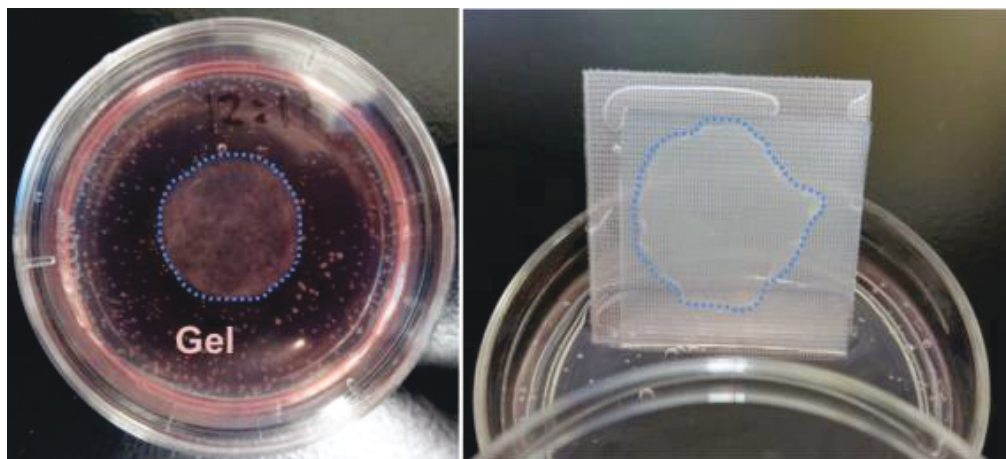


図 3-6. コラーゲンゲルへの接着面の違いによる細胞シートの接着力の評価。左図：基底面での貼付ではシェーカー振盪に耐える強固な接着が確認された。右図：表層面での貼付ではゲルに接着できず、基底面が向いたナイロンメッシュをかぶせたシリコンのおもりの方へ接着した。双方とも、インキュベーション時間 60 分後に接着挙動を評価した。

### 3.3.3 コラーゲンゲルへの接着後の NHEK 細胞シートのタンパク質発現パターンの変化

細胞シートをゲルに接着させてから 1 日後の切片を免疫染色によって解析すると、上層での発現パターンはほとんど変化がなかったが、基底層では発現パターンに差異があった。細胞-細胞間接着を担う E-cadherin は、接着前において基底層で Positive であったが (HP, 37.8%; P, 19.0%; LP, 16.8%, N, 26.3%)、接着 1 日後では Negative と判定された (HP, 0.2%; P, 1.2%; LP, 7.9%, N, 90.7%)。また、 $\beta$ -catenin も接着前は (HP, 1.9%; P: 9.6%; LP, 40.4%; N, 48.1%) であったのに対し、(HP, 1.8%; P: 9.2%; LP, 28.9%; N, 60.2%) となり、共に LP に分類されたが、Negative の割合が上がっており、発現の低下が観察された。また、高い間葉系の性質を持つ細胞に特徴的な  $\beta$ -catenin の核内移行は観察されなかった。これより、細胞間接着が低下したと考えられた。さらに、基底層では Vimentin が発現しており (HP, 37.5%; P: 24.9%; LP, 22.2%; N, 15.3%)、細胞間接着を解き、間葉系の性質の一部が観察された。さらに、接着前は基底層で Negative と判定されたリン酸化ミオシン (P-MLC) は (HP, 1.5%; P: 4.2%; LP, 10.4%; N, 83.9%)、接着後に Low positive として発現しており (HP, 0.5%; P: 8.4%; LP, 35.0%; N, 56.1%)、接着後の細胞シートは全層にわたって性状が動的に変化すると考えられた (図 3-7)。これより、接着後の細胞シートの基底層では、細胞間接着を解くという EMT の初期段階に特徴的な挙動が観察され、遊走能を持つことが示唆された。

Type XVII collagen は接着前と接着後の両方で発現し、その部位もほとんど変わらず、細胞基底層の基底表面ならびに細胞-細胞間に発現が見られた。一方、接着前は基底表面ならびに細胞間に位置していた Integrin  $\beta$ 4 は、発現のレベルは接着の前後で変わらなかったものの (接着前: HP, 10.3%; P: 17.9%; LP, 30.5%; N, 41.4%; 接着後: HP, 1.9%; P: 9.6%; LP, 40.4%; N, 48.1%)、接着後は細胞-コラーゲンゲル間に位置し、細胞-コラーゲンゲル接着に働くことが示唆された。これらの基底層の発現パターンを IHC Profilar で解析した結果を表 3-3 に記載した。



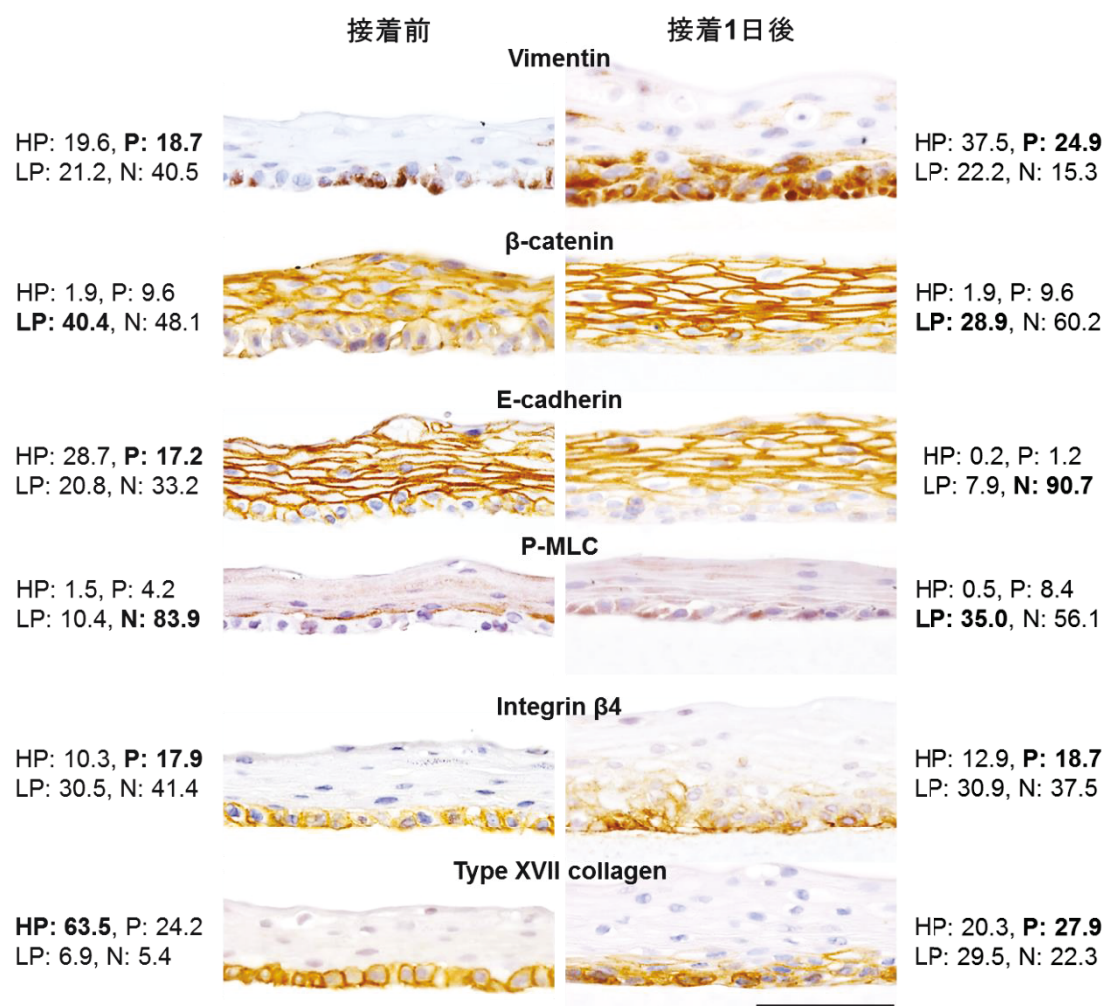


図 3-7. ゲルへの接着前後でのタンパク質発現パターンの変化。左カラム：温度応答性インサートから回収直後の遊離の細胞シート。右カラム：接着 1 日後の細胞シート。IHC Profilar で基底層の発現の強さを測定し、High positive (HP)、Positive (P)、Low positive (LP)、Negative (N) の割合をそれぞれの結果の隣に記載した。さらに、最終的な発現の強さを太字で記載した。スケールバー：100  $\mu$ m。【[1]より改変・転載】

表 3-3. IHC Profiler による接着前後の NHEK 細胞シートの基底層の免疫染色結果の定量化。

	接着前				接着 1 日後			
	HP	P	LP	N	HP	P	LP	N
E-cadherin	28.7	<b>17.2</b>	20.8	33.2	0.2	1.2	7.9	<b>90.7</b>
$\beta$ -catenin	1.9	9.6	<b>40.4</b>	48.1	1.8	9.2	<b>28.9</b>	60.2
Vimentin	19.6	<b>18.7</b>	21.2	40.5	37.5	<b>24.9</b>	22.2	15.3
Phospho-myosin light chain 2 (Thr 18/Ser 19)	1.5	4.2	10.4	<b>83.9</b>	0.5	8.4	<b>35.0</b>	56.1
Type XVII collagen	<b>63.5</b>	24.2	6.9	5.4	20.3	<b>27.9</b>	29.5	22.3
Integrin $\beta$ 4	10.3	<b>17.9</b>	30.5	41.4	12.9	<b>18.7</b>	30.9	37.5

HP: High Positive、P: Positive、LP: Low Positive、N: Negative。最終的な発現の強さを白抜きで記載した。【[1](#)】より改変・転載】

### 3.3.4 NHEK 細胞シート接着後の遊走挙動

重層扁平上皮細胞シートの縁を位相差顕微鏡によって観察すると、細胞シートの厚みのために基底層と上層の焦点深度が異なり、おおよそ基底層と上層を判別することが可能であった。接着直後（0 日目）の細胞シートを位相差顕微鏡で観察すると、基底層と上層が一様に重なっていた（図 3-8）。この接着後の細胞シートを 3 日間培養すると、細胞シートの縁から基底層細胞がコラーゲンゲル上を遊走している様子が観察された。培養 7 日後にはこの遊走が顕著に表れた（図 3-8）。

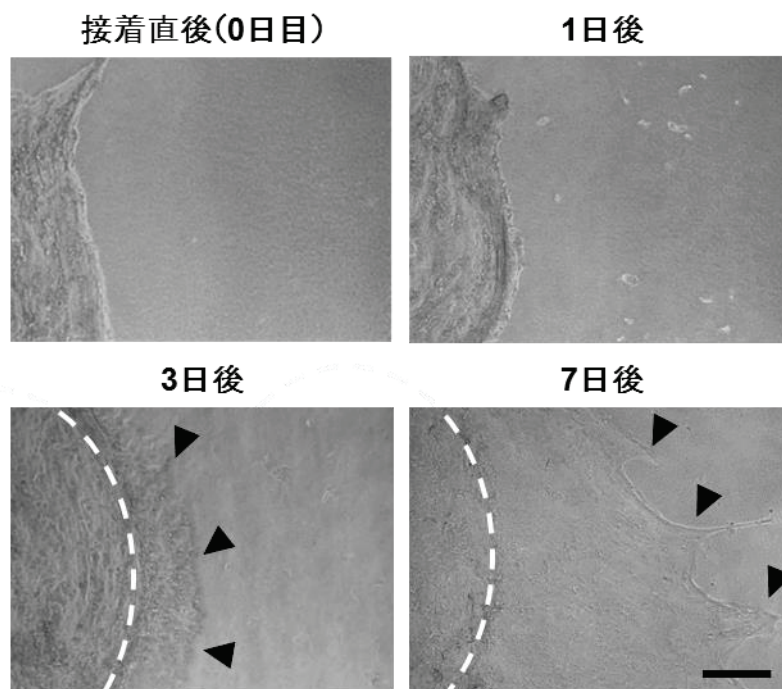


図 3-8. 位相差顕微鏡観察による上皮細胞シートにおける細胞遊走。白破線：細胞シートの上層の縁、黒矢頭：遊走細胞の先端部位。スケールバー：400  $\mu\text{m}$ 。【[1](#)】より改変・転載】

遊走挙動を示す培養期間での細胞シートを Pan-cytokeratin で免疫染色し、Type I collagen の染色像と合わせて組織学的に解析すると、培養 7 日後でもコラーゲンゲルとの接着を維持したことが示された（図 3-9）。他のタンパク質も免疫染色によって解析したところ、遊走する細胞が観察されたシートの先端部では 1-4 層からなり、Integrin  $\beta 1$ 、Integrin  $\beta 4$  が陽性であった。細胞シート作製の細胞播種時を起点とすると、培養 17 日目であるため、細胞シートの中央部位で分化が

進んでおり、厚みのあるところでは 10 層以上重なっていた。中央部位の上層には分化マーカーである K1、Filaggrin が強く発現していた。これらは、遊走の先端部位には発現していなかった。これより、細胞シートの遊走は基底細胞が先導したことが示され、前節と整合性があった。

E-cadherin および  $\beta$ -catenin は基底細胞の横に隣合うの細胞間にほとんど発現していなかったが、基底層-基底上層の細胞間ならびに上層の細胞同士の間に発現しており、数層の細胞を繋ぎ止めていると推測された。また、Vimentin の発現は遊走の先端部位の基底層で発現していた。したがって、接着 1 日後で観察された Partial EMT が基底層で維持されており、この結果遊走が起こったことが推察された。

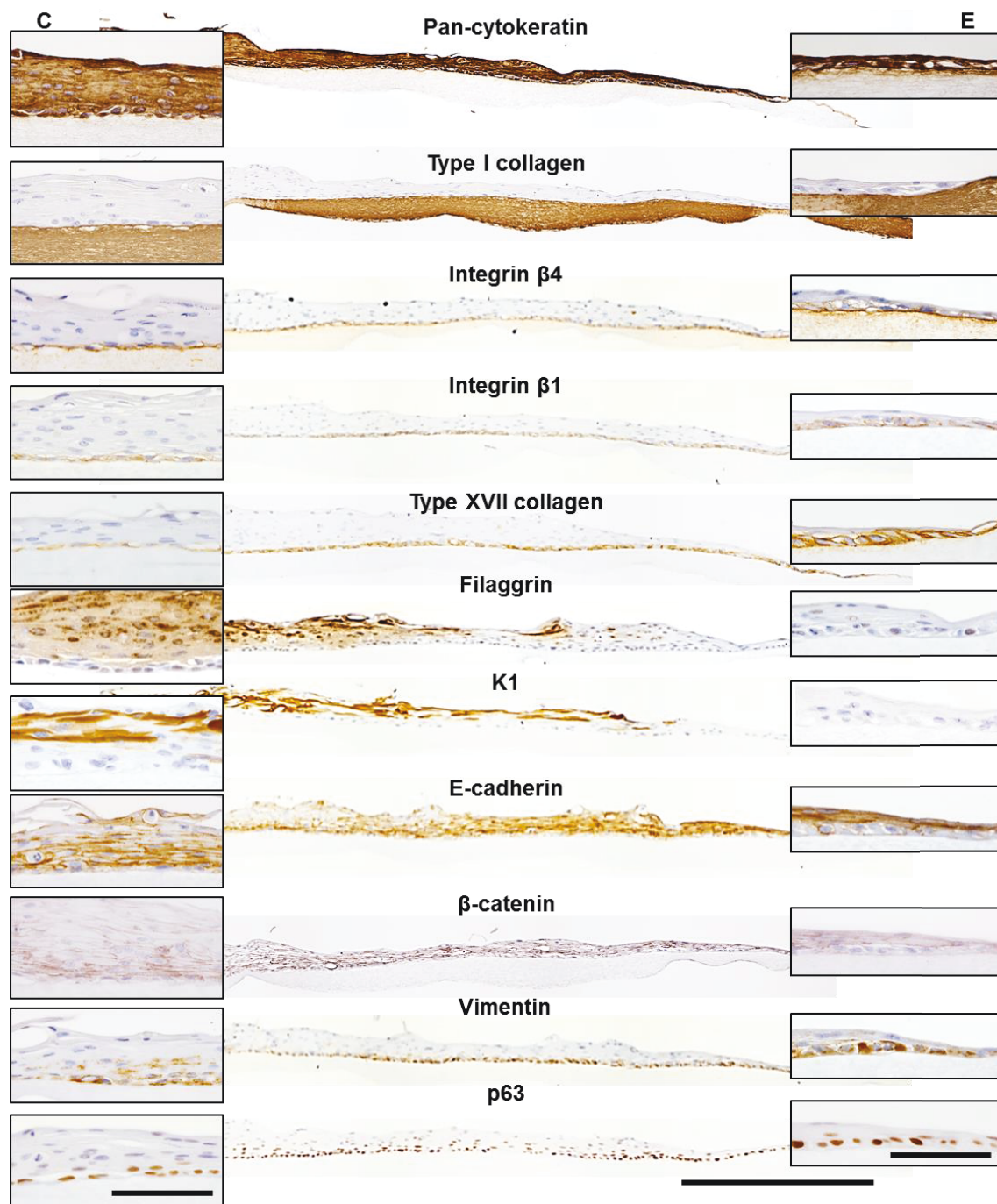
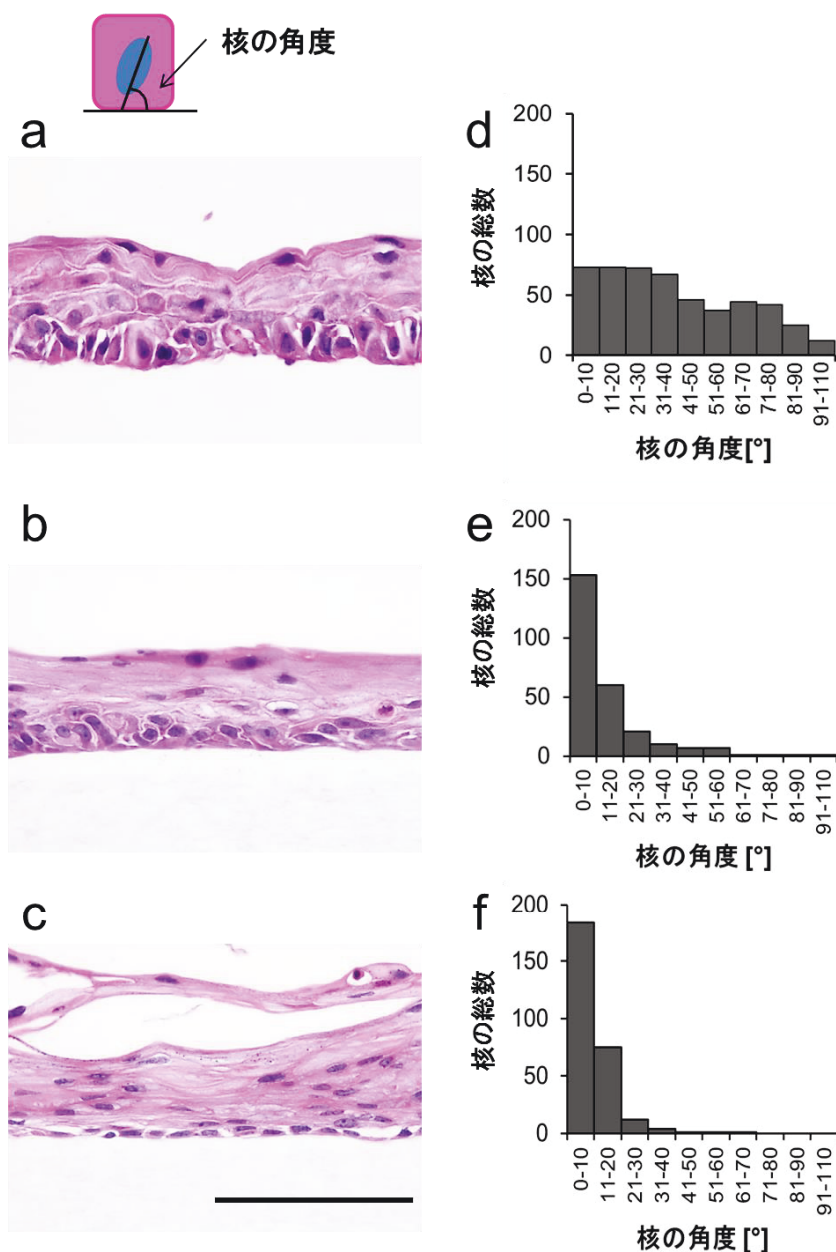


図 3-9. 培養 7 日後の免疫染色による遊走細胞が観察される細胞シートのタンパク質発現パターン。C：細胞シート中央部位、E：遊走細胞が見られる細胞シートの先端部位。スケールバー：500  $\mu\text{m}$ （中央像）、100  $\mu\text{m}$ （左右挿入像）。【[1]より改変・転載】

経時的に回収したサンプルを HE で染色し、細胞シート基底面の細胞膜に対する基底層の核の角度を Image J によって解析した。剥離直後は細胞シートの収縮に伴って基底面に対して垂直に近い核も観察されたのに対して、接着後は遊走



に伴うアクチンストレスファイバーの張力が働くと考えられ、核の角度が接着面に対して平行に近づいている観察結果が得られた（図 3-10）。



**図 3-10.** Image J による細胞シートの基底層細胞の核の角度解析。(a, b, c) HE 染色像。(d, e, f) 核の角度のヒストグラム。縦軸：核の数、横軸：角度分布。(a, d) 剥離後の遊離の細胞シート、平均 38.7°。(b, e) 接着 1 日後の細胞シート、平均 13.5°。(c, f) 接着 7 日後の細胞シート、平均 9.0°（計測した核の総数 = 1032, n = 5）。スケールバー：100  $\mu$ m。【[1](#)】より改変・転載】

観察された細胞シートの細胞遊走は、細胞増殖によって細胞が押し出されていたのか、Partial EMT による集団的遊走がなされていたのかどうかを調べるために、増殖マーカーである Ki67 の免疫染色を行い、陽性細胞数をカウントすることによって定量化した。その結果、貼付により Ki67 陽性細胞の数が統計的に有意に減少するものの（接着前  $143.5 \pm 73.5$  cells、接着 1 日後  $35.9 \pm 29.1$  cells）、接着後 1 日と 7 日では有意な差は見られなかった（図 3-11）。これより、遊走挙動が増殖に起因するものではないことが強く示唆された。

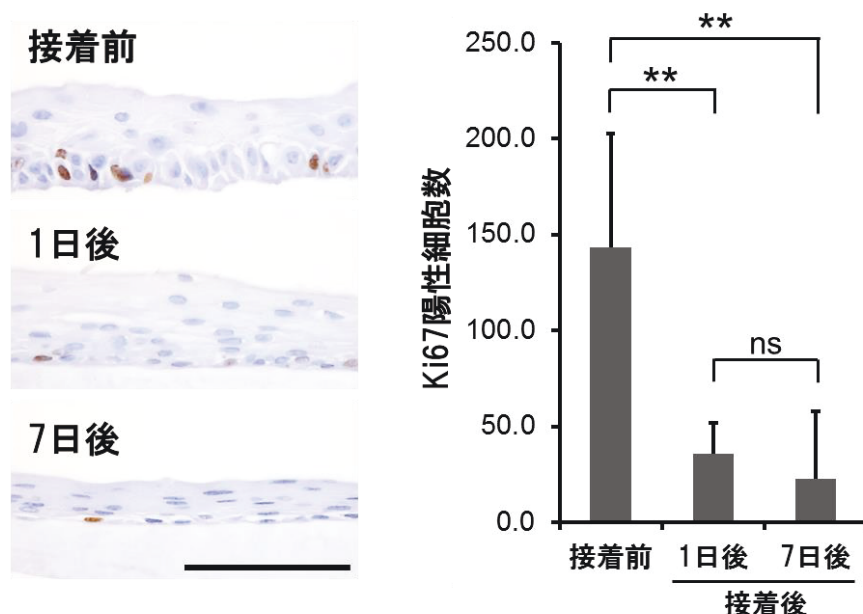


図 3-11. Ki67 陽性細胞数の測定による細胞増殖の定量化。左：Ki67 免疫染色結果。上段：剥離後の遊離の細胞シート、中段：接着 1 日後の細胞シート、下段：接着 7 日後の細胞シート。右図：Ki67 陽性細胞数測定。縦軸：Ki67 陽性細胞数平均値、横軸：サンプル名。1 枚の切片における平均値±標準偏差：剥離後の細胞シート  $143.5 \pm 73.5$  cells、接着 1 日後の細胞シート  $35.9 \pm 29.1$  cells、接着 7 日後  $22.6 \pm 32.8$  cells。合計 45 個の試料における細胞数を測定した (n=5)。スケールバー：100  $\mu$ m。【[1](#)]より改変・転載】

以上の結果より、細胞シートは仮想の創傷床であるコラーゲンゲルに接着後、基底層の細胞が集団的に遊走することが分かった。この挙動は創傷治癒時の上皮組織の遊走パターンに類似していると考えられた。これより、上皮細胞シートが生体の上皮組織同様に細胞の遊走による創傷治癒の能力を持ち、コラーゲンゲル上を被覆すると考察された。

### 3.3.5 NHEK 細胞シートの集団的遊走パターン

細胞シートが創傷治癒能力をもつ仮説を立証し、創傷の面積に対して必要な細胞シートの枚数などを決めるためには、遊走挙動を経時的に観察し、被覆範囲や遊走速度などを定量化することが重要である。

この遊走パターンや速度を解析するために、特に細胞シートの縁に注目し、30 分毎に 7 日間にわたって位相差顕微鏡を用いてタイムラプス撮影を行った。

接着初期段階である 0-2 日目では、前節と同様に細胞シートの縁からの遊走細胞がほとんど観察されず、むしろ、細胞シート全体が後退する挙動が観察された(図 3-12a, b)。このタイムラプス観察結果から、Image J の PIV プラグインを用いて微小領域毎のベクトルマップを作成し細胞シートが動いた方向を示したところ(図 3-12c)、速い部分では  $30\ \mu\text{m}/\text{h}$  を超える速度で退縮が起こっていた。このように、重層扁平上皮細胞シートの遊走挙動は一方向に進むだけではないことを見出した。

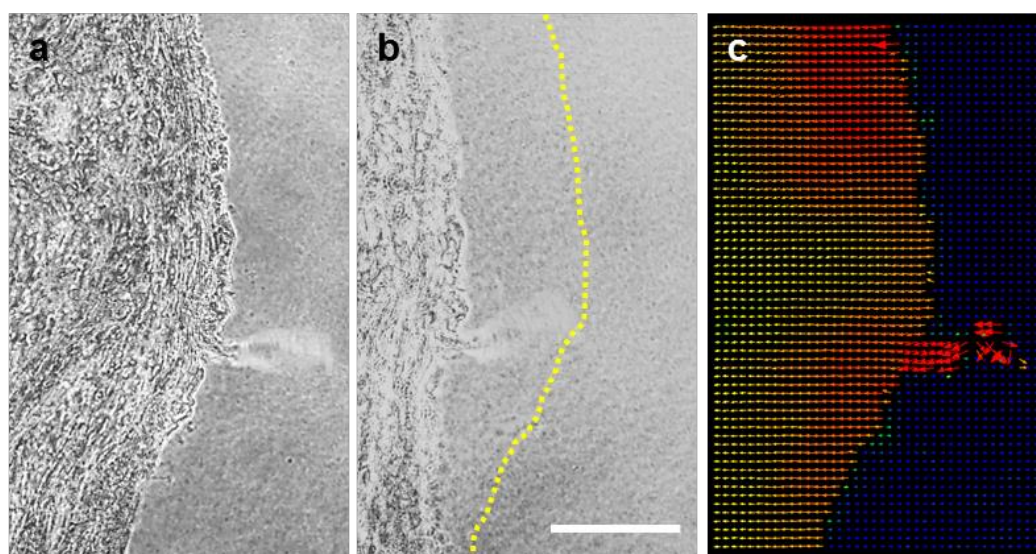


図 3-12. 接着 0-2 日目の細胞シートの遊走挙動。(a) 細胞シート接着 0 日目。(b) 細胞シート接着 2 日目。黄色破線：0 日目の細胞シートの縁の位置。(c) PIV 解析による接着 0 日目の細胞の遊走運動のベクトルマップ。細胞シートの遊走方向と距離および速さがそれぞれ矢印の方向と長さおよび色で表記されている（速度：赤： $30.0\ \mu\text{m}/\text{h}$ ；橙： $26.7\ \mu\text{m}/\text{h}$ ；黄： $20.0\ \mu\text{m}/\text{h}$ ；緑： $13.4\ \mu\text{m}/\text{h}$ ；青： $6.7\ \mu\text{m}/\text{h}$ ；紫： $\leq 6.7\ \mu\text{m}/\text{h}$ ）。スケールバー： $400\ \mu\text{m}$ 。



細胞シートが後退する挙動は細胞シートの収縮が関与すると考えられた。剥離直後の NHEK 細胞シートを接着せずに浮遊させた状態を維持すると、温度応答性インサート上での培養時と比べて約半分にまで直径が収縮した (図 3-13)。この後、KCM 内で浮遊の状態を維持すると、1 日後にはさらに収縮する様子が観察された。これより細胞シートは剥離されて基底層細胞が足場を失うと、徐々に収縮することが示された。剥離回収直後にコラーゲンゲルに接着させると剥離直後の大きさを維持したことからも、細胞シートが接着し基底層細胞が遊走したことで、細胞シートの収縮を抑制することができたと考えられた。

免疫染色によって P-MLC の発現を確認すると、剥離前の細胞シートは全層に発現していた。剥離直後の細胞シートは上層に発現が見られる一方で、基底層では発現が低下した。剥離 1 日後でも同様に上層で発現し、基底層で発現しておらず、直径は約半分に収縮していた。これらのことから、リン酸化ミオシンは上層で細胞間接着の強化に働き、これが剥離後の細胞シートの収縮に深く関わっていると推察された。一方で、細胞シートをコラーゲンゲルに接着させると 1 日後には基底層で P-MLC の発現が回復しており、ほぼ剥離直後の直径を維持していた。これらのことから、基底層のリン酸化ミオシンは細胞シートの接着に伴って発現すると共に、外方向への遊走に関与し、細胞シートの内方向への収縮を抑制していることが示唆された (図 3-13)。

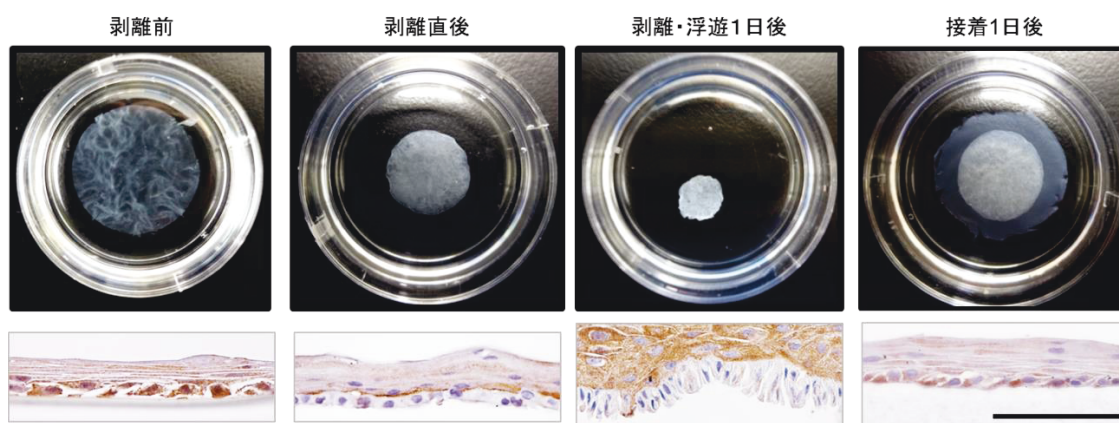


図 3-13. 細胞シートの収縮挙動。上段：各段階での細胞シートの形状。培養器材は 35 mm dish。下段：各段階での P-MLC 免疫染色における切片像。スケールバー：100  $\mu$ m。【[1]より改変・転載】

接着 2-4 日目では、細胞シート全体が収縮と伸展を交互に繰り返し、細胞シートの端に位置する細胞もこの動きに同調して遊走方向を反転させる運動が観察された (図 3-14a, b)。このような遊走方向の反転は前例がない挙動であった。

この遊走挙動についてベクトルマップを作成すると、同一方向のベクトルを持つ中規模の領域が数ヵ所見出された (図 3-14c)。すなわち、接着後の細胞シートの基底層では E-cadherin による細胞間接着が減少して、個々の細胞は運動の自由度を得るものの (図 3-7、図 3-9)、ある程度は同調して遊走することを明らかにした。

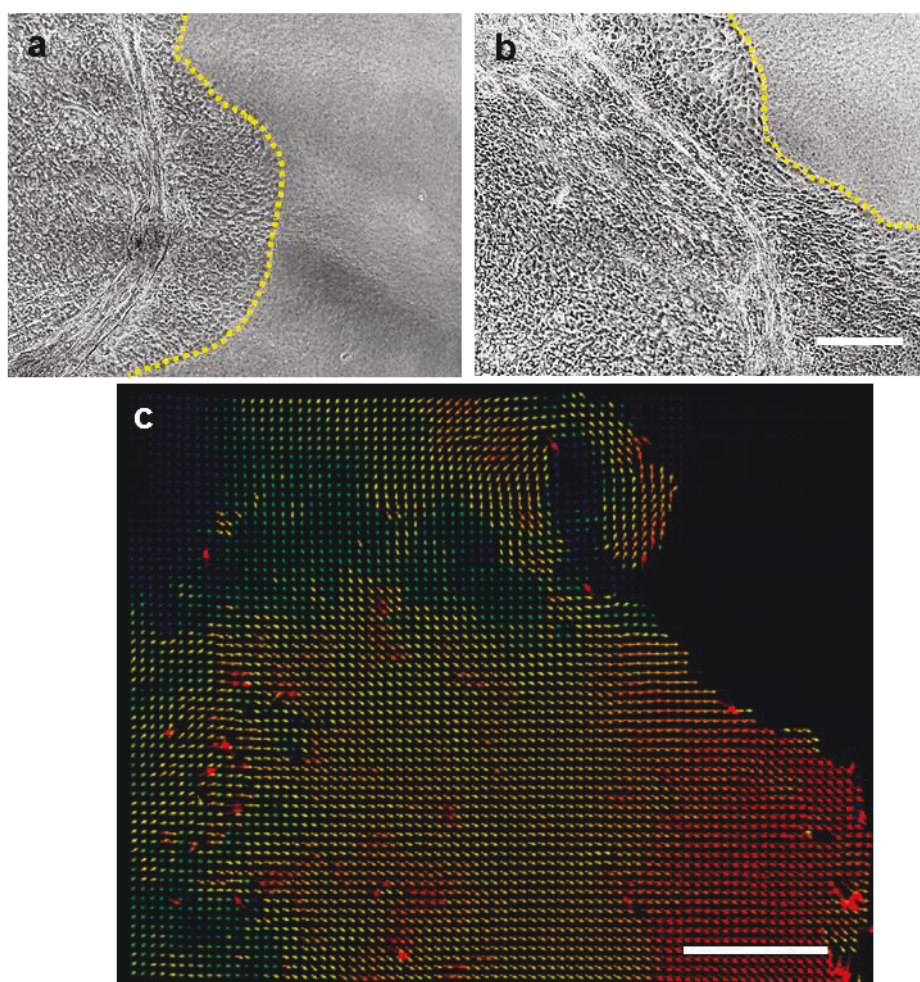


図 3-14. 位相差顕微鏡による細胞シート遊走の経時的観察。(a) 接着 2 日目。(b) 接着 4 日目。黄色破線：細胞シート基底層の縁。(c) PIV 解析による接着 4 日目の細胞の遊走運動のベクトルマップ。細胞シートの遊走方向と距離および速さがそれぞれ矢印の方向と長さおよび色で表記されている (速度：赤:  $36.7 \mu\text{m/h}$ ; 橙:  $30.0 \mu\text{m/h}$ ; 黄:  $20.0 \mu\text{m/h}$ ; 緑:  $13.3 \mu\text{m/h}$ ; 青:  $6.7 \mu\text{m/h}$ ; 紫:  $\leq 6.7 \mu\text{m/h}$ )。スケールバー：400  $\mu\text{m}$ 。【[1]より改変・転載】

これより、接着後の NHEK 細胞シートは静的かつ固定された構造を持つのではなく、各細胞の配置を動的に変化させ、全体として運動することが明らかとなった。

さらにタイムラプス画像の詳細な観察からは、細胞シートの上層と基底層とは異なる方向に運動するケースも観察された。特に、シートの縁に突出している基底細胞の遊走が顕著に大きく、**図 3-8** で観察された細胞シートの縁での新たな一層の細胞層の出現は、細胞シートの退縮により基底層現れたのではなく、上層の収縮挙動に勝る運動性をもつ基底層の細胞の集団的遊走によるものであることが明らかになった。

細胞シート接着後 5-7 日目では収縮挙動がほとんど観察されなくなり、外方向への遊走挙動がほとんどであった。さらに、基底細胞の遊走に同調して上層も共に移動し、結果として細胞シート全体が動く挙動も観察された (**図 3-15**)。上層で Partial EMT 挙動が観察されておらず、基底層-基底上層の細胞間接着が維持されていたことから (**図 3-7**、**図 3-9**)、遊走する基底層細胞に上層が引きずられたものと考えられた。



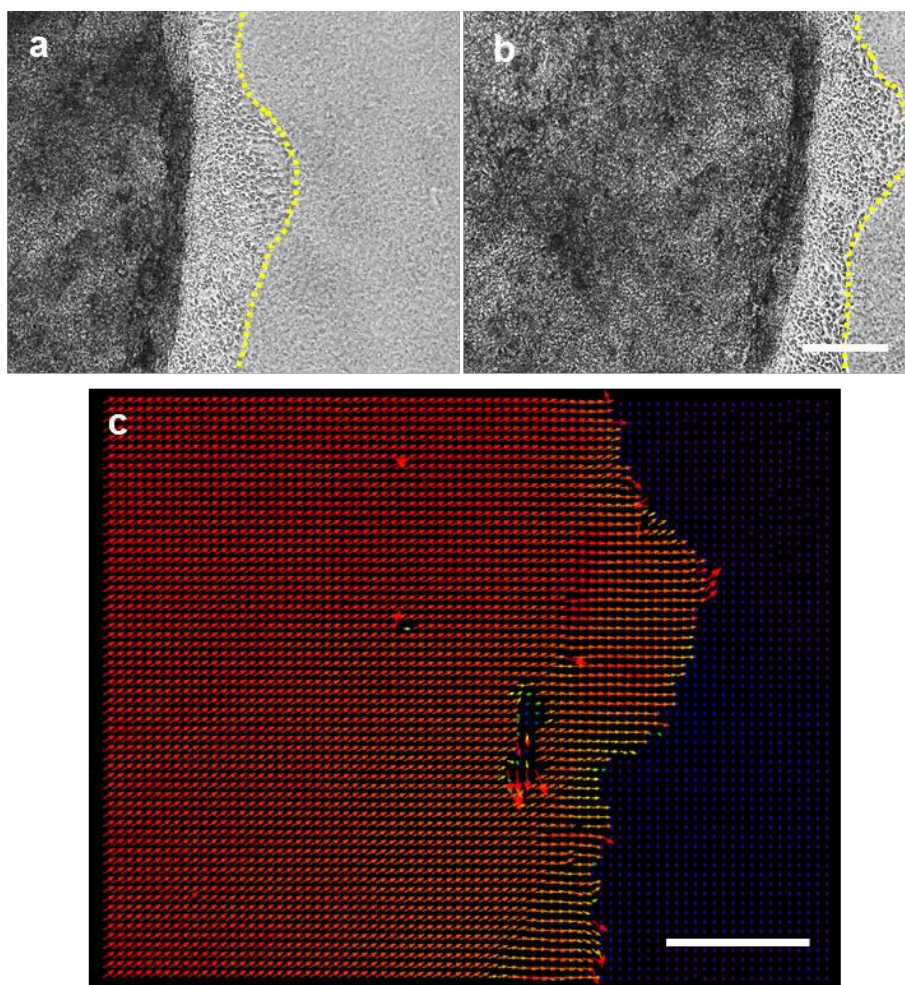


図 3-15. 細胞シート遊走の経時的観察。(a) 接着 5 日目。(b) 接着 6 日目。黄色破線：細胞シート基底層の縁。(c) PIV 解析による接着 6 日目の細胞の遊走運動のベクトルマップ。細胞シートの遊走方向と距離および速さがそれぞれ矢印の方向と長さおよび色で表記されている（速度：赤: 46.7  $\mu\text{m/h}$ ; 橙: 36.7  $\mu\text{m/h}$ ; 黄: 26.7  $\mu\text{m/h}$ ; 緑: 20.0  $\mu\text{m/h}$ ; 青: 10.0  $\mu\text{m/h}$ ; 紫:  $\leq 10.0 \mu\text{m/h}$ ）。スケールバー：400  $\mu\text{m}$ 。

接着 7 日目の細胞シートを観察すると、およそ全周にわたり遊走細胞が観察された（図 3-16a）。これより、細胞シートは等方的に伸展し、創傷部位を被覆する能力があることが示唆された。しかし、本モデル実験においては被覆面積は接着直後と大きく変わらず、むしろ収縮している結果も得られた（図 3-16b）。*In vitro* の本実験系はコラーゲンゲルのみで作製されており、結合組織に加えて線維芽細胞など多くの構成要素が存在する実際の創傷床とは状況が大きく異なることに由来することも考えられた。

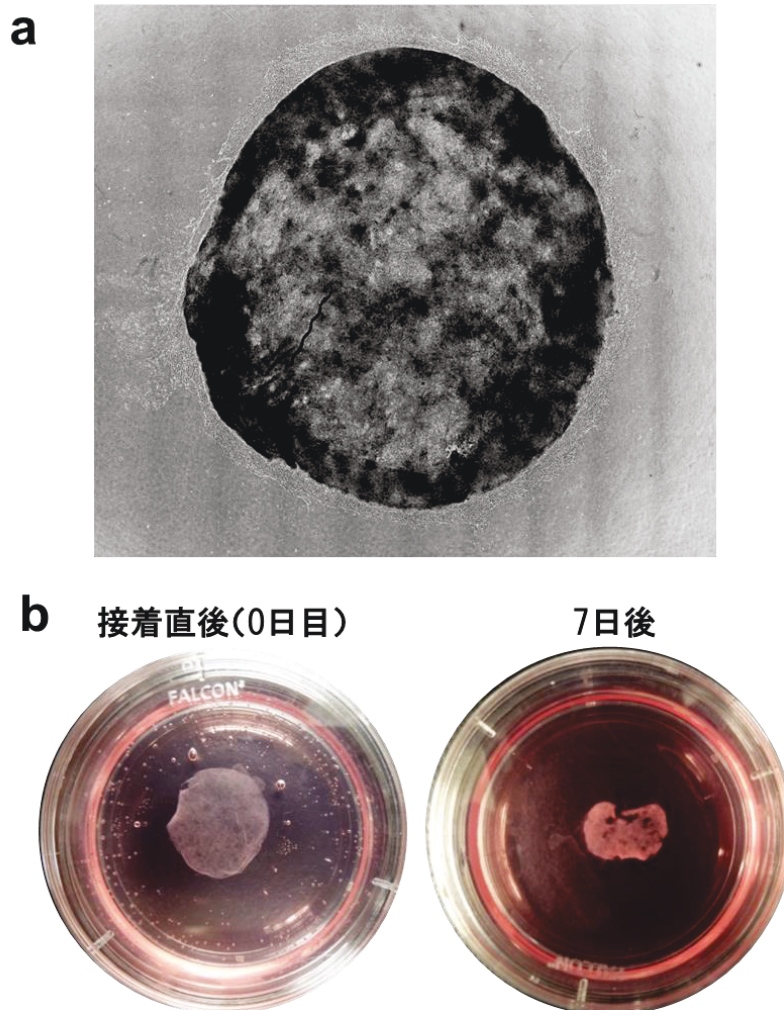


図 3-16. 接着 7 日後の細胞シート。(a) 位相差顕微鏡観察による細胞シートの全体像。(b) 接着培養前後の細胞シート。【[1](#)]より改変・転載】

### 3.3.6 ゲル内包埋細胞による NHEK 細胞シートの遊走能の変化

前節までの結果から、Partial EMT を起こした基底層の遊走や上層の収縮など、重層扁平上皮細胞シートの接着後の基本的な細胞挙動を理解することができた。細胞シートの創傷治癒機構をさらに詳細に明らかにするため、創傷床により近い系での細胞シートの挙動を評価した。このため、ヒト線維芽細胞である Normal human dermal fibroblast (NHDF) 細胞を包埋したコラーゲンゲルに NHEK 細胞シートを接着させてその後の挙動を解析した。第一章で論じた通り、線維芽細胞は上皮組織下の結合組織に多く存在し、上皮細胞の増殖や創傷治癒促進などに重要な役割があることが知られている[\[15\]](#)。

線維芽細胞との共培養実験における接着 7 日目の上皮細胞シートを観察すると、上皮細胞が 35 mm 培養皿の隅にまで遊走した部分も観察されるなど、細胞シートが全体的に大きく広がった (図 3-17)。また、細胞シートの上層の縁が不明瞭となり面積拡大によりシートが薄くなったことも推察された。上皮細胞の遊走能の増大は創傷床を被覆して創傷治癒を促進することを意味するため、線維芽細胞が豊富な創傷床への細胞シートの移植は治癒効果を向上させると考察された。

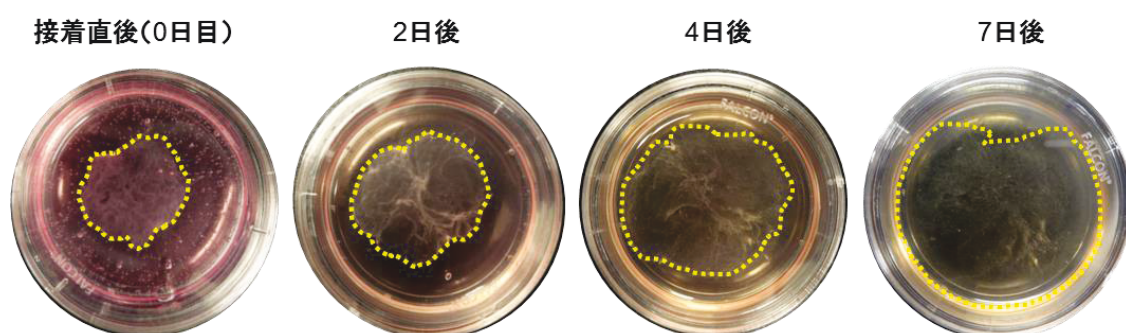


図 3-17. 線維芽細胞 (NHDF) をゲル内に包埋して共培養した際の、NHEK 細胞シートの遊走面積の増大。黄色破線：細胞シートの縁の位置。培養器材は 35 mm dish。

線維芽細胞を包埋したゲルの場合、接着 2-4 日目の段階で細胞シートの収縮挙動が観察されず、伸展方向への遊走細胞が観察された (図 3-18a, b)。ベクトルマップを作成すると、 $60 \mu\text{m/h}$  を超える速度での遊走が観察された。これより、線維芽細胞は、接着 2-4 日目の段階で上皮細胞の遊走速度をおよそ 2 倍に上昇させる効果があることも示された。(図 3-18c)。



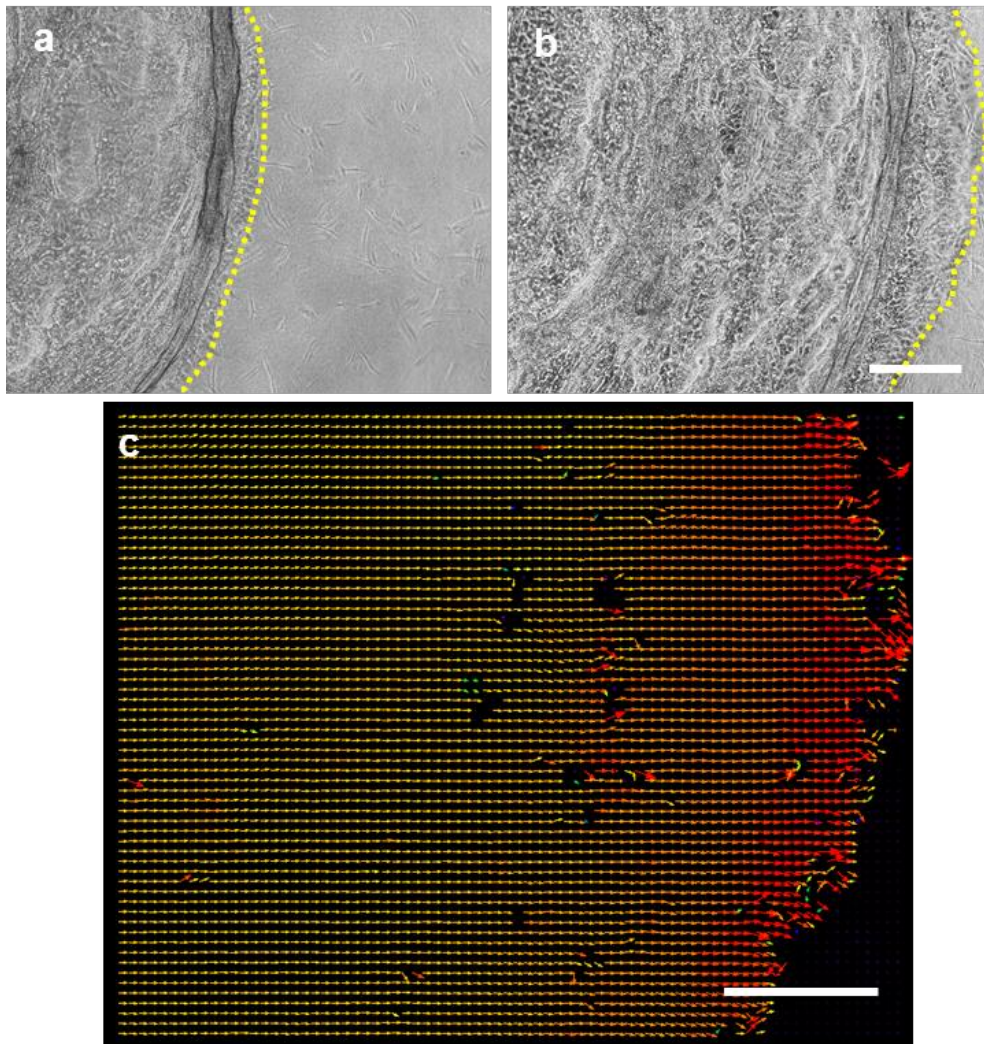


図 3-18. 線維芽細胞をゲルに包埋した条件での細胞シート遊走の経時的観察。(a) 接着 2 日目。(b) 接着 3 日目。黄色破線：細胞シート基底層の縁。(c) PIV 解析による細胞の遊走運動のベクトルマップの代表例。細胞シートの遊走方向と距離および速度がそれぞれ矢印の方向と長さおよび色で表記されている（速度：赤:  $66.7 \mu\text{m/h}$ ; 橙:  $53.3 \mu\text{m/h}$ ; 黄:  $40.0 \mu\text{m/h}$ ; 緑:  $26.7 \mu\text{m/h}$ ; 青:  $13.3 \mu\text{m/h}$ ; 紫:  $\leq 13.3 \mu\text{m/h}$ ）。スケールバー： $400 \mu\text{m}$ 。【[\[1\]](#)より改変・転載】

ゲルへ線維芽細胞を添加し共培養した細胞シートを免疫染色によって解析をした（図 3-19）。細胞シートは一様に 1-4 層からなっており、線維芽細胞と共培養しない場合と比べて薄くなっていることが観察されたが、NHEK 細胞シートのタンパク質発現パターンはほとんど同様であった。非共培養時に上層に発現する Filaggrin がほとんどみられないとの違いは見られたが、これは上層が剥がれ落ちたことによると考えられた。ゲル表面に存在する細胞シートは Pan-cytokeratin が陽性であり、この Pan-cytokeratin 陽性細胞のゲル内浸潤はみら

れなかったことから、上皮の性質をある程度保ったまま、コラーゲンゲルとの接着を維持していたことが示された。E-cadherin と  $\beta$ -catenin が上層でも発現が低下しているようにも見られたが、Vimentin の発現は非共培養時と同じく接着した基底層にのみ発現しており、基底層で Partial EMT が起こっていたと考えられた。あるいは、基底上層においては Vimentin が発現しない程度の、初期の Partial EMT が起こったとも考えられた。Ki67 陽性細胞の数も増大してはならず、Partial EMT の挙動やタンパク質発現パターンは線維芽細胞非存在下と変わらないまま、遊走が亢進されて細胞シート伸展したことが示された。

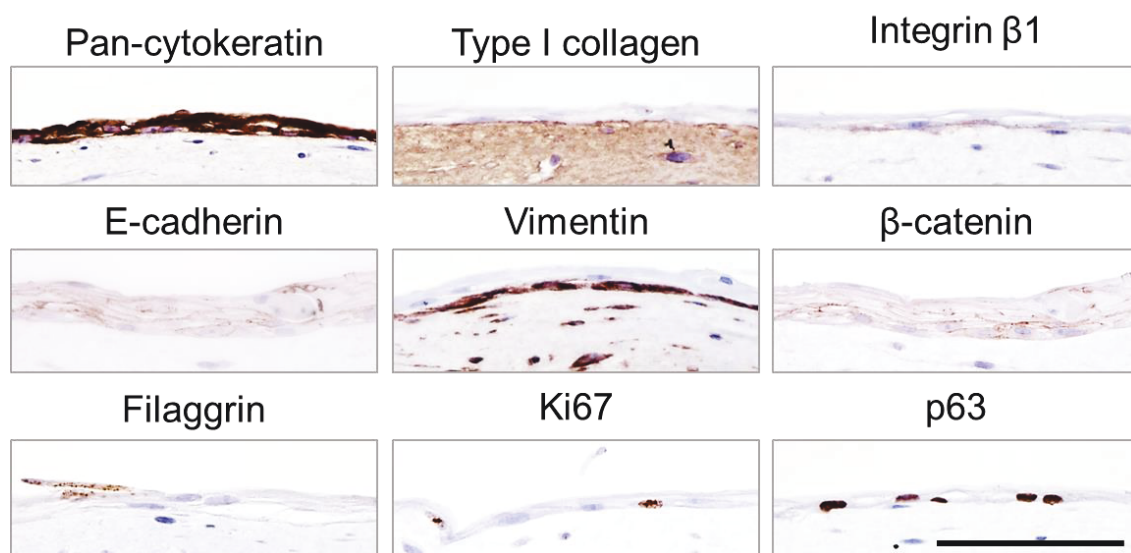


図 3-19. 線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲル上で NHEK 細胞シートを共培養して 7 日後の免疫染色像。スケールバー100  $\mu$ m。【[1](#)】より改変・転載】

食道癌切除後の創傷床では I 型コラーゲンの結合組織に、様々な細胞が存在している。そこで創傷床に存在し得る細胞をコラーゲンゲルに包埋し、上皮細胞シートと共培養してシートの挙動に与える効果を評価した (図 3-20)。ヒト大動脈平滑筋細胞である AoSMC を包埋した場合、接着 7 日後の NHEK 細胞シートは包埋細胞なしと比べて顕著に伸展した。一方で、ヒト臍帯静脈内皮細胞である HUVEC の包埋では細胞シートの伸展が見られなかった。NHDF : AoSMC : HUVEC : HSMM を 1 : 1 : 1 : 1 で混合して包埋させたコラーゲンゲルも作製し (Mix)、同様の実験を行うと、やはり伸展が観察されが、NHDF のみの方が広く伸展する傾向にあり、NHDF や AoSMC などの影響に大きいと考えられた。



また、NHDF と同じ線維芽細胞であるが、NHEK と種が異なるマウス由来の 3T3 においては増殖にバラツキがあり、増殖が顕著な場合は細胞シートの伸展が見られたが増殖が遅い場合は細胞シートがほとんど伸展しないといったように、安定した結果は得られなかった。

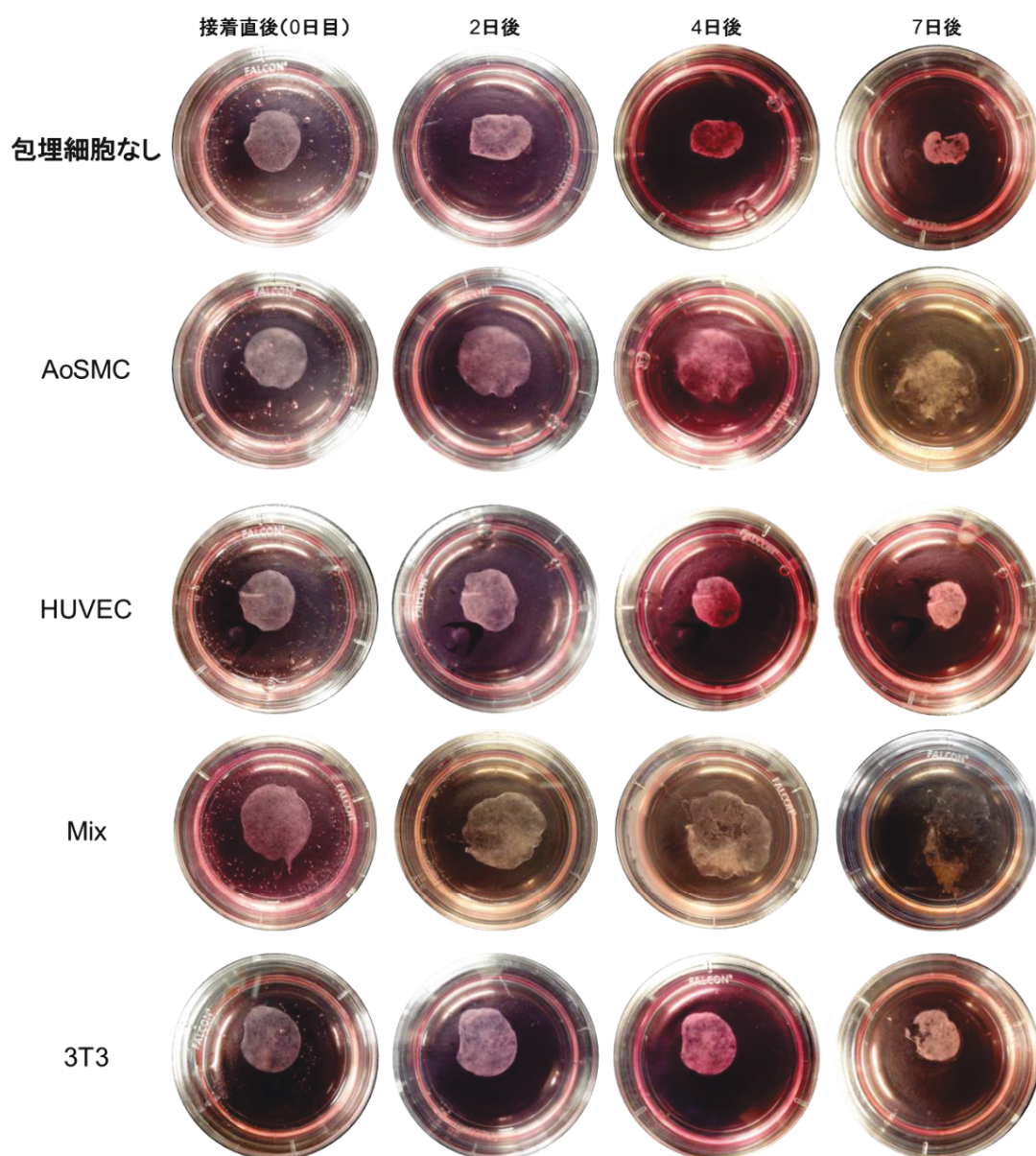


図 3-20. 様々な細胞を包埋したゲルへの NHEK 細胞シート接着後の経時的観察。コラーゲンゲル内に  $1 \times 10^4$  cells/mL で包埋した細胞種を記載した。なお、Mix は NHDF : AoSMC : HUVEC : HSMM = 1 : 1 : 1 : 1 の割合 (各  $2.5 \times 10^3$  cells/mL) で包埋させた。培養皿は 35 mm dish。

前述のように細胞シート伸展が顕著であった NHDF ならびに AoSMC を包埋したコラーゲンゲル内を位相差顕微鏡によって観察すると、細胞シートが被覆していない部位にも細胞が多く観察されていたため、この 2 種類の細胞は増殖していたことが確認された。一方で、HUVEC をコラーゲンゲルに包埋した場合、HUVEC 伸展・増殖は観察されなかった (図 3-21)。この一因として、上皮細胞の増殖・分化に最適化された KCM には血管内皮増殖因子などの血管内皮細胞の増殖に必要な因子が含まれていないことによると考えられる。しかし、NHEK 細胞シートの遊走を阻害することはなく、細胞シートの縁から基底層の遊走が観察された。

これらの結果から、包埋細胞が増殖して上皮細胞シートと直接相互作用している可能性もあるが、包埋細胞が分泌する生体シグナル因子が上皮細胞シートの遊走能の上昇に効果的である可能性が高いと考えられた。

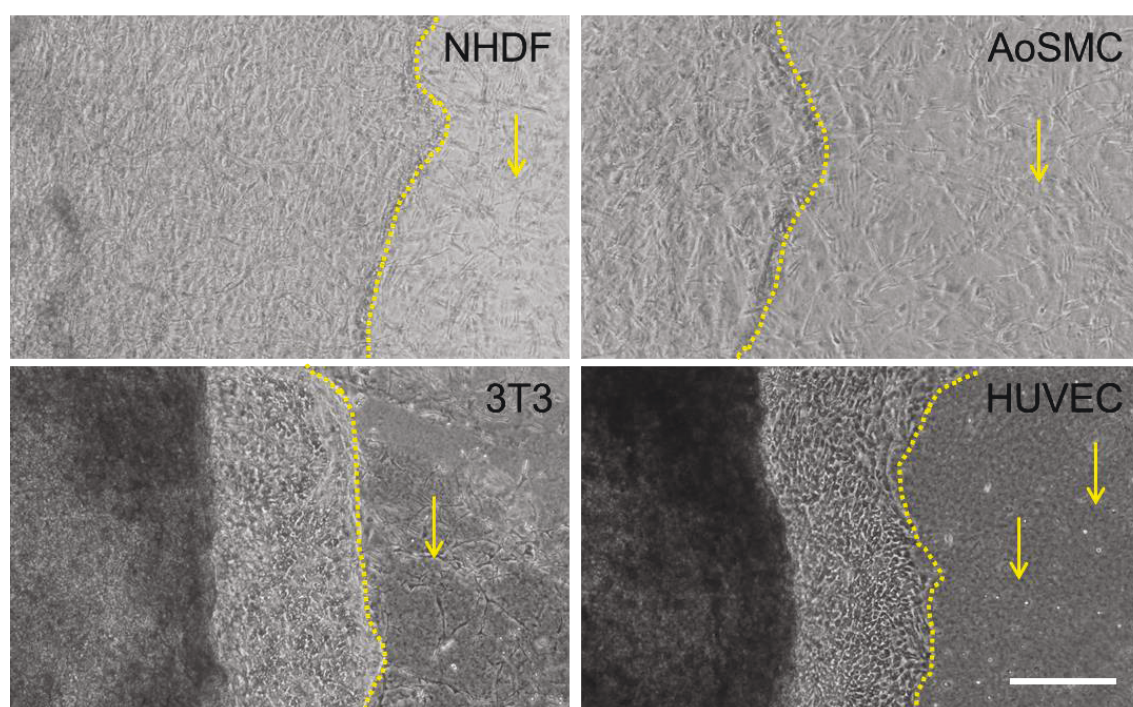


図 3-21. コラーゲンゲル内に包埋した細胞と NHEK 細胞シートの位相差顕微鏡観察。黄色破線：細胞シートとコラーゲンゲルの界面で、破線より左には NHEK 細胞シートが存在する。一方、破線より右にはコラーゲンゲルと、これに包埋された細胞が観察できる。矢印：コラーゲンゲル内の包埋細胞。スケールバー：400  $\mu\text{m}$ 。



また、NHDF の存在下でも、細胞シートの端が寄っていて丸まっていると、その方向への細胞遊走が顕著でなかった (図 3-23)。細胞シートという多くの細胞からなる構造体のなかで多くの細胞が接着している部分と接着していない部分があると、接着した部分の細胞シートの縁の多くの細胞がラメリポディアを形成して遊走することが明らかになった。このことから、細胞シートの遊走・伸展には細胞シートの縁の細胞群が重要な役割を果たすと考えられる。また、ある程度均等に接着が形成されると多方向の細胞遊走が起こり、これに伴って細胞シートの伸展がなされることが考えられた。

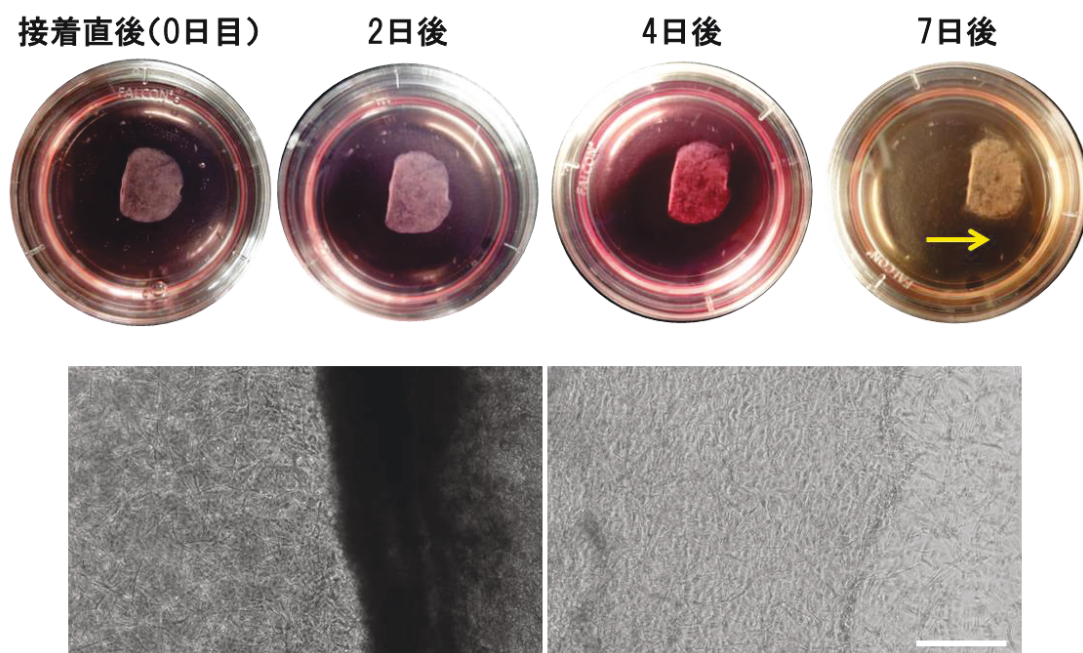


図 3-22. 基底細胞のラメリポディアの重要性。上段：NHDF 包埋ゲルに接着した NHEK 細胞シートの経時観察。下段：接着 7 日目の位相差顕微鏡観察。下段左図：寄れている部位。下段右図：寄れていない部位。スケールバー：400  $\mu\text{m}$ 。

### 3.3.7 mRNA 発現解析と阻害剤添加実験

細胞シートの接着前後での上皮マーカーならびに間葉系マーカーの発現量を定量的に評価するため、RT-PCR による mRNA 発現解析を行った。ターゲット遺伝子として Vimentin (*VIM*)、E-cadherin (*CDH1*)、N-cadherin (*CDH2*)、Type XVII collagen (*COL17A1*)、Ki67 (*MKI67*)、p63 (*TP63*)、Filaggrin (*FLG*)に加えて、間葉系マーカーである、Fibronectin (*FN1*)、Twist (*TWIST1*)も対象とし、% GAPDH 法で定量化した。しかし、細胞シート接着の前後でこれら上皮マーカーならびに間葉系マーカーの mRNA 発現は、統計的有意を示す程には差がないとの結果が得られた (図 3-23)。

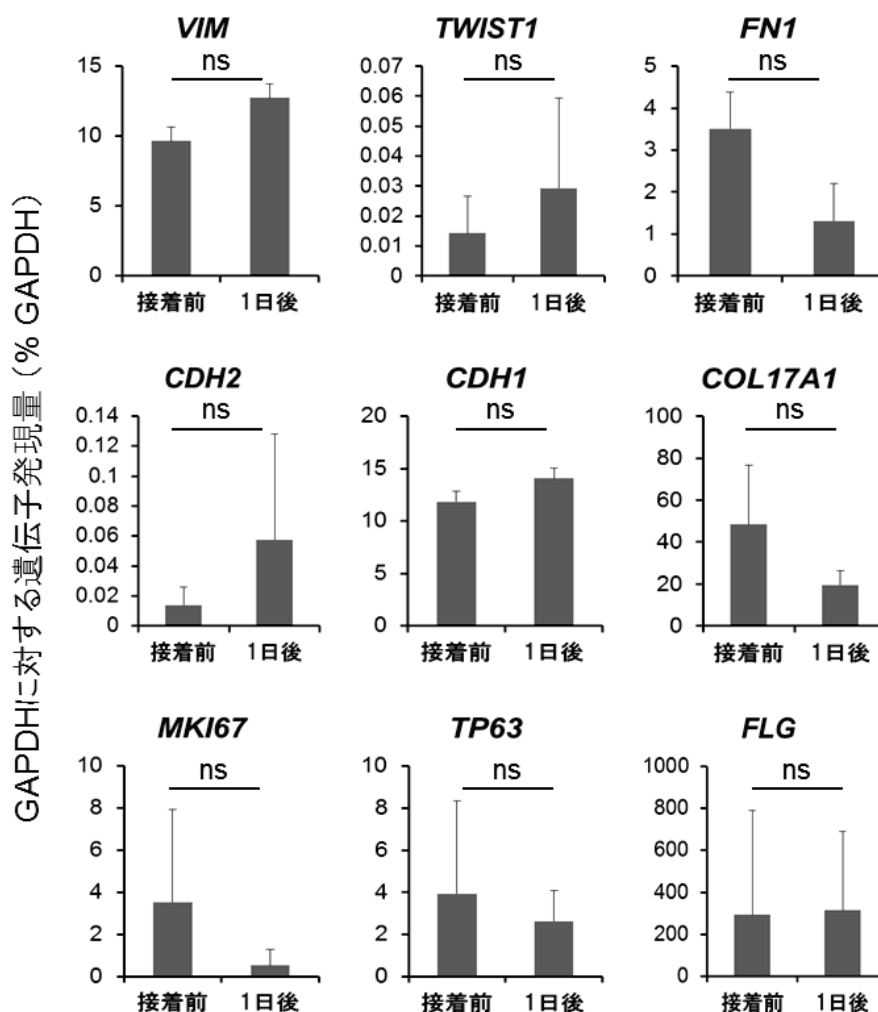


図 3-23. 定量 PCR による遺伝子発現解析。縦軸：% GAPDH、横軸：サンプル名、左図：接着前の細胞シート、右図：接着 1 日後の細胞シート。(n = 3) 【[1](#)】より改変・転載】

細胞シート接着後の免疫染色実験では、EMT の特徴とされる E-cadherin ならびに  $\beta$ -catenin の減少が見られたことから、 $\beta$ -catenin がこの EMT 挙動に重要であり、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路を介した EMT が起こったと考えられた[16, 17]。そこで、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の阻害剤である Imatinib の添加や[10, 18]、促進剤である SB216763 を加え[11]、各細胞シートの遊走挙動を観察した。この二つの試薬を添加すると、どちらも遊走を抑制した (図 3-24)。

ここで Imatinib は Wnt/ $\beta$ -catenin 経路のみならず、PDGF 経路も阻害する試薬として知られているため、次に PDGF 経路を仮定して、PDGF receptor kinase inhibitor (PDGF RKI) を用いた実験も行ったところ、遊走能を顕著に抑制した。これらのことから、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の促進剤で遊走能促進がなされなかったため、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路で EMT が起こっている可能性は低いと考えられた。一方で、PDGF 経路の可能性は残っており、阻害剤の濃度の検討やシグナルの上流および下流の因子をそれぞれ阻害する実験により詳細な知見が得られると期待される。

また、他の有名な EMT 経路である TGF- $\beta$ 1 経路の阻害剤である TGF- $\beta$ 1 receptor kinase inhibitor (TGF- $\beta$ 1 RKI) を加えた実験も同様に行ったが、細胞シートの縁から遊走細胞が観察されており、TGF- $\beta$ 1 経路ではない EMT 経路であることが示唆された。

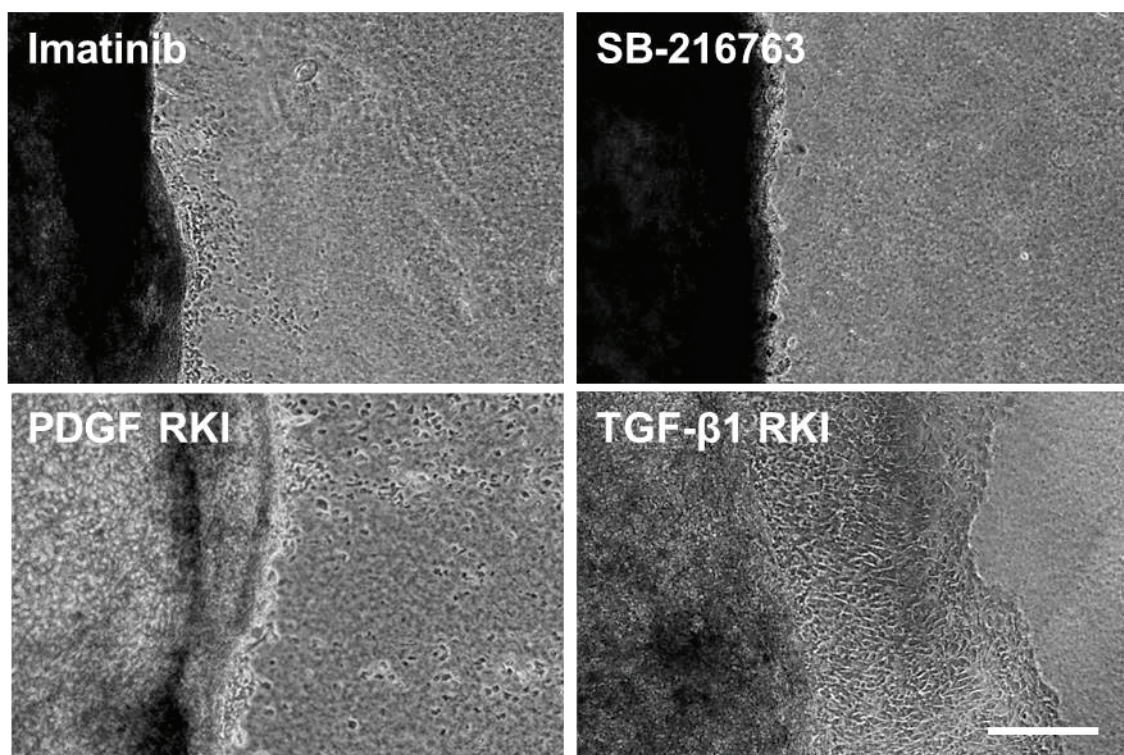


図 3-24. 阻害剤添加による細胞遊走への影響。接着 7 日後の位相差顕微鏡観察像、スケールバー：400  $\mu\text{m}$ 。

阻害剤を添加しても細胞シートの形状は温存されており、免疫染色によって発現タンパク質を解析した結果、Imatinib、SB-216763、PDGF RKI で E-cadherin や  $\beta$ -catenin の発現が全体的に減少しており、全体的に細胞間接着が弱いと考えられた。さらに、 $\beta$ -catenin の核内移行はここでも観察されず、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路で EMT が起こっていないことを支持した。さらに、細胞シートの形状を維持しながら組織切片を作製することが困難であったことから、薬剤添加による細胞毒性による遊走阻害の可能性が示唆された。さらに、細胞死に伴い、細胞間接着が弱まっていたことを支持した。Filaggrin の発現は顕著に亢進していたことより（図 3-25）、上皮層の分化はターンオーバーに向けて進んでいたと考えられる。また、Imatinib、SB-216763、PDGF RKI で Vimentin の発現は基底層よりもむしろ基底上層に発現しており、Vimentin は分解されてはいなかったが、遊走には関与していないことが示唆された。これらの結果より、 $\beta$ -catenin の挙動から仮定した Wnt/ $\beta$ -catenin 経路、PDGF 経路、TGF- $\beta$ 1 経路によって EMT が誘導された可能性は低いと考察された。



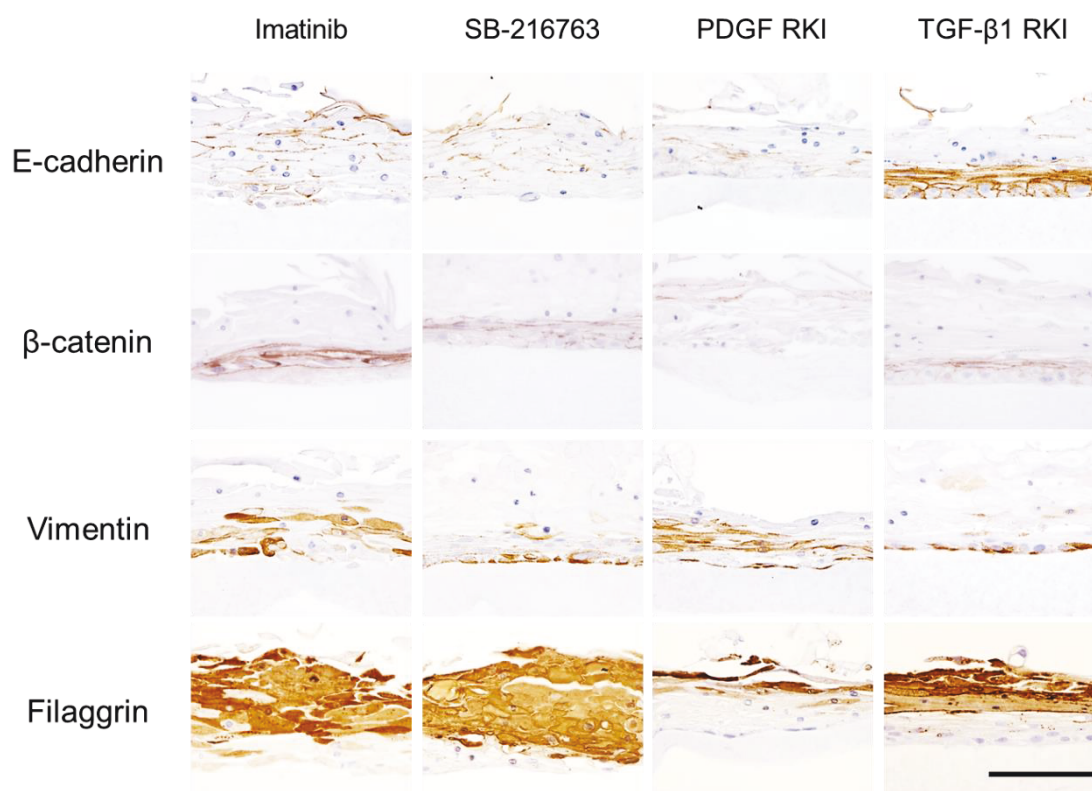


図 3-25. 阻害剤添加時の免疫染色によるタンパク質発現パターンの解析。阻害剤添加から 7 日後の細胞シートの免疫染色像。スケールバー：100  $\mu$ m。

遺伝子発現解析と阻害剤添加実験結果から上皮細胞シートの基底層では、E-cadherin が担う細胞間接着が低下して遊走する程度の EMT の第一段階は起こっていたが、これは、 $\beta$ -catenin が核内移行して転写因子として働き、浸潤能を持つ間葉系の性質を獲得するまでには至らない程度の Partial EMT であったことが考察された。

### 3.3.8 上皮細胞シートに関するその他の知見

上皮細胞シートを用いた食道再生では、約 3 週間で創傷の上皮の再生が完了する。この期間における細胞シートの挙動を理解するため、長期間培養した際の細胞シートの挙動を解析した (図 3-26)。接着 21 日後においても細胞シートはコラーゲンゲルとの接着を維持しており、接着 7 日目と同様に基底層で E-cadherin の発現が低かった。一方で、Vimentin と p63 の発現が見られ、細胞の活性はあると考えられた。Ki67 はほとんど発現がみられなくなったことより、

遊走能ならびに増殖能は低下傾向にあると考えられた。上層に Filaggrin の発現はほとんど見られなかったことから、上皮細胞は分化して剥がれ落ちたと考えられた。一方で、Integrin  $\beta$ 1、Integrin  $\beta$ 4、Type XVII collagen は残存しており、3週間後でも細胞シートの基底層は接着を維持し、食道の創傷床を被覆し続けられる能力がある可能性が示唆された。

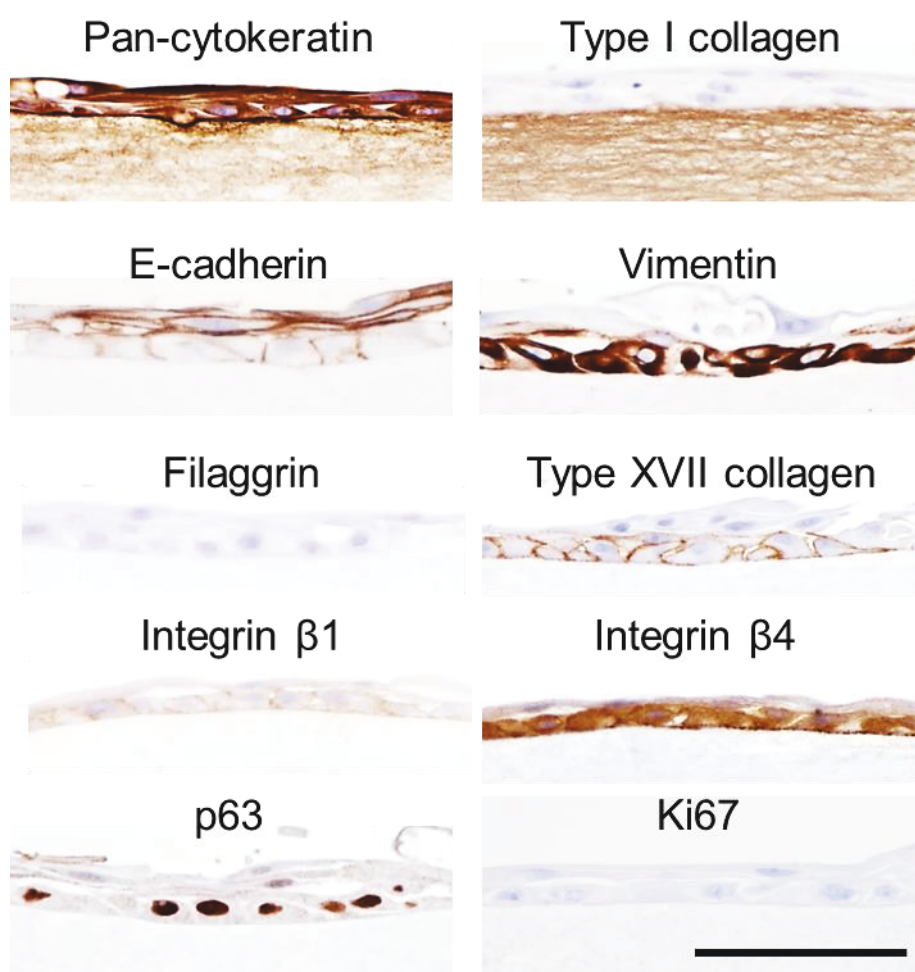


図 3-26. 接着 21 日後の細胞シート切片の免疫染色像。スケールバー：100  $\mu$ m。【[1](#)】より改変・転載】

また、温度応答性インサートから剥離回収のためピンセットで操作している際に、細胞シートの一部が破れてしまうこともあった。しかし、マイクロメートルの範囲の小さな損傷は数時間で埋められた (図 3-27)。これも細胞シートを構成する細胞の遊走能を示す結果である。すなわち、細胞シートの移植による



創傷治癒では、シートの一部が損傷しても自己修復して創傷部位全体を被覆し、高い治療効果が得られると考察された。

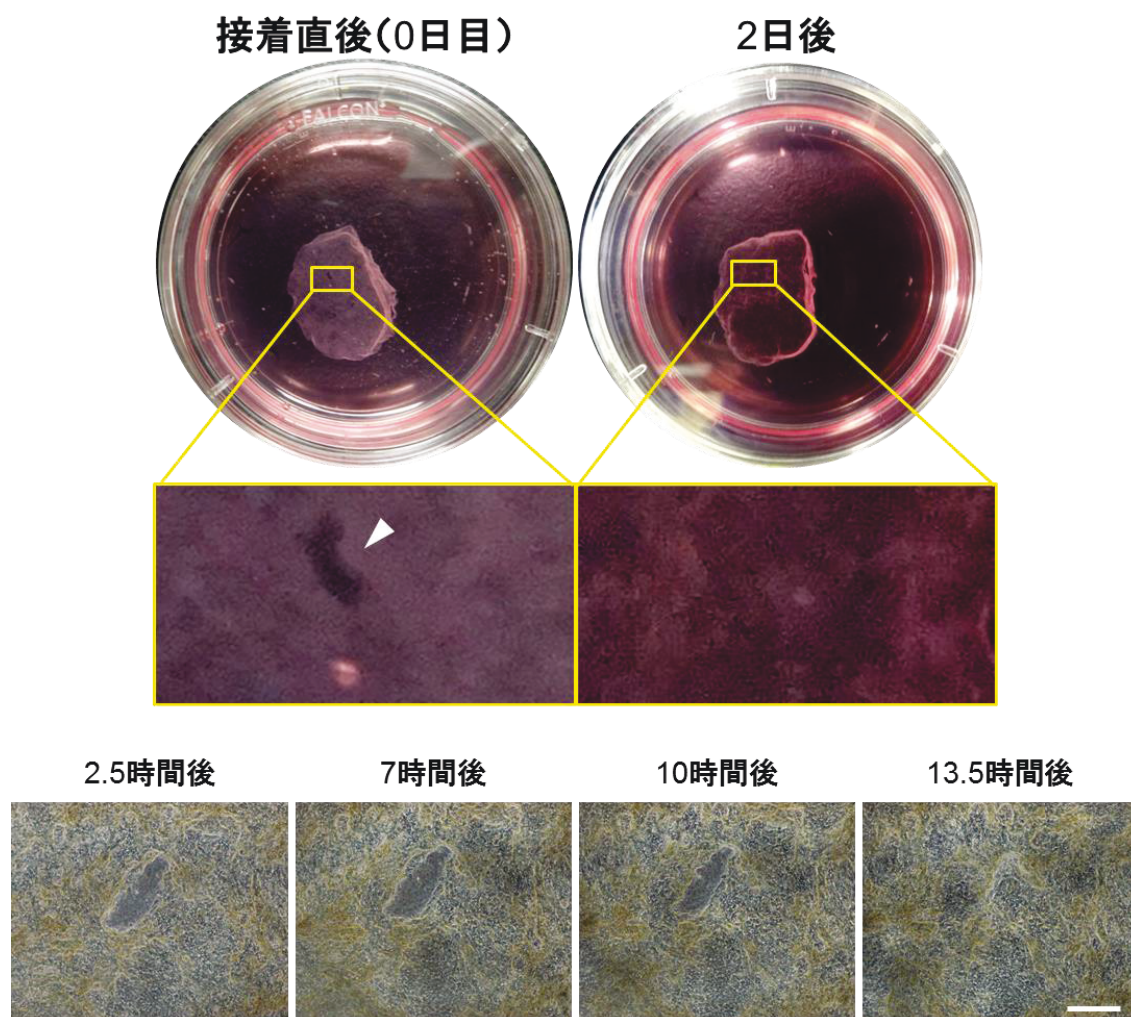


図 3-27. 上皮細胞シートにおける自己修復能。長軸約 674  $\mu\text{m}$ 、短軸 218  $\mu\text{m}$  の穴(上段矢頭、下段)は上皮細胞の遊走により、13.5 時間後に塞がった。スケールバー：400  $\mu\text{m}$ 。

### 3.4 考察

#### 3.4.1 I型コラーゲンをを用いた細胞シート接着の *in vitro* モデル実験

細胞シートのような細胞群を移植する再生医療は、機能が損なわれた組織・器官を代替・再生する未来の医療として期待されている。このためには前述の通り、臨床試験を蓄積して安全性を高めていくアプローチも重要であるが、モデル系や実験動物を用いた基礎研究により接着・移植後の細胞シートの動態を分子レベルで明らかにし、治療の効果を科学的に実証することも必要である。

食道粘膜癌切除後の創傷床の約 50%を覆うように重層扁平上皮細胞シートを移植すると、術傷が早く治り、狭窄を予防できる臨床結果が得られている[19]。しかし、患者に移植後の細胞シートの動態を非侵襲的に解析することは大変難しいため、術後観察のみに留まっており、細胞シートの細胞はどのように組織の再生に寄与するのか未だに不明確である。そこで、本研究ではI型コラーゲンをを用いて細胞シートの接着後の挙動を詳細に評価出来得るシンプルな *in vitro* モデルを考案し、細胞シート接着後の経時的変化を詳細に解析した。

コラーゲンゲルの他に、I型コラーゲンコート、ラミニンコートまたはフィブロネクチンコートをしたディッシュ、さらにフィブリンゲルやマトリゲルでも同様の実験を行ったが、細胞シートはほとんど接着できなかった。接着先のタンパク質がほとんど同じであっても、細胞シートが接着する適切な硬さやインテグリンが認識するタンパク質の重要性が示唆された。

これらの検討を踏まえてI型コラーゲンゲルの *in vitro* モデルを確立した。結果に示した通り、ゲルと細胞シートが隙間なく激しい振盪にも耐えられる強固な接着を形成することができ、接着後の細胞シートの挙動を観察・解析するのに適した実験系を確立することに成功した。

#### 3.4.2 接着前の遊離の NHEK 細胞シートの性状

NHEK 細胞は容易に入手することができ、細胞播種も簡便であると共に、継代をすることにより多くの細胞が得られる利点がある。さらに、ヒトの上皮細

胞であるため抗体の研究が進んでいることや臨床に直接的に応用出来ることなどから、NHEK 細胞シートは本研究を進める上で適していると考えられる。

NHEK 細胞から作製した上皮細胞シートは、強固な細胞間接着や 100  $\mu\text{m}$  もの厚みがあるなど重層化上皮の特性を適切に維持した組織片になり、重層扁平上皮細胞シートの接着後の挙動を解析するのに適していたことを免疫染色によって確認した (図 3-2)。

温度応答性インサートから剥離し、ゲルに接着前の NHEK 細胞シートの基底層では Laminin 5、Integrin、Type XVII collagen といった細胞-基質接着に重要なタンパク質が発現し、タンパク質分解酵素を使わないで細胞を回収できる温度応答性インサートの有用性を改めて確認することができた。このうち、Laminin 5 は培養の間に上皮細胞から分泌されることが知られており[20, 21]、本実験の細胞シートでも Laminin 5 は基底層全体に発現が見られ、基底層細胞が分泌したことが確認された。さらに、Integrin  $\beta 4$  は細胞間にも発現が見られた。Integrin が細胞間の結合を担う分子機構の報告はほとんどないが、Integrin  $\beta 4$  は、上皮細胞が分泌した Laminin 5 の受容体であるため[22, 23]、これを Integrin  $\beta 4$  が認識することによって細胞間にも Integrin  $\beta 4$  が存在していたと考えられる。細胞の Integrin がマトリックスタンパク質を認識すると、接着斑タンパク質を集積させてアクチンの重合を促す。このアクチンはリン酸化ミオシンと相互作用し、細胞が遊走・増殖能を獲得することが広く知られている[3]。また、Laminin 5 は上層には発現が見られず、分化すると Laminin 5 の産生が低下するもしくは産生されないことが免疫染色の結果からわかった。これらのことから、NHEK 細胞シートが極性を持ち、基底層と上層の性質が顕著に異なっていることを示し、基底層が基質と強い結合を形成していたことも支持した。

NHEK 細胞シートの上層では K1 や Filaggrin が発現し、機械的強度が高いと考えられた。さらに、リン酸化ミオシンとアクチンの複合体であるアクトミオシンは、カドヘリンを介して上皮のバリア機能の発現に寄与することが知られている[24, 25]。よって、上層に発現していたリン酸化ミオシンはアクチンならびにカドヘリンと相互作用して細胞間の隙間をなくしてバリア機能を高めるように働き、これが細胞シートとして剥離した後の自発的な収縮と関連すると考えられた。

このように接着前の細胞シートは上層と基底層で挙動も異なっていることを明らかにした。これらの知見をまとめた、温度応答性インサートから剥離した直後の細胞シートの模式図を図 3-28 に示す。

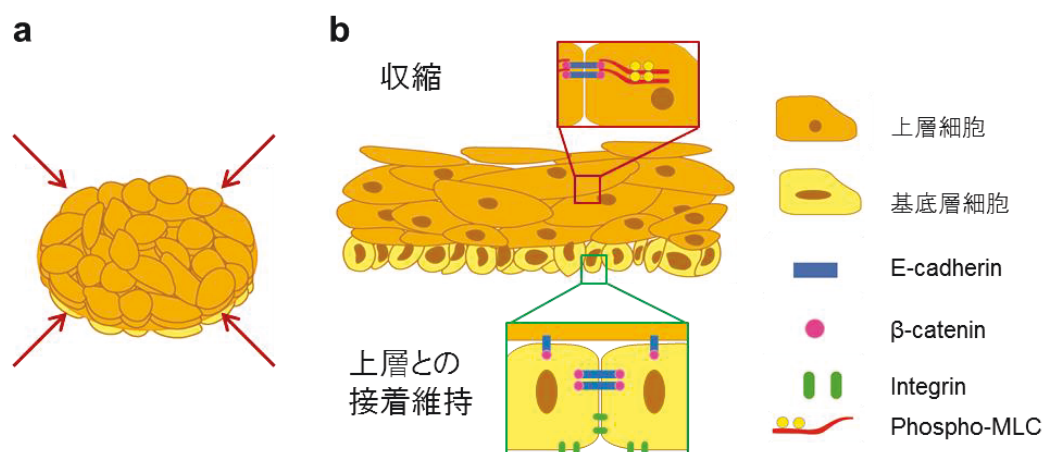


図 3-28. 剥離直後の重層扁平上皮細胞シートの模式図。(a) 自発的な収縮を伴う遊離の重層扁平上皮細胞シート。(b) 細胞シートの断面図と代表的なタンパク質発現パターン。上層ではカドヘリンとリン酸化ミオシンによって高い細胞間接着があり、基底層では核が垂直に近く、インテグリンが発現し、遊離の状態ではリン酸化ミオシンの発現がほとんどない。【[1]より改変・転載】

### 3.4.3 重層扁平上皮細胞シート接着後の初期挙動

作製した重層扁平上皮細胞シートをコラーゲンゲルへ接着させる際、基底面を向けて接着させると強固な接着がなされた一方で、上層面を向けて接着させると細胞シートが接着できなかったことから、基底層に発現する接着タンパク質が働いて細胞シートはコラーゲンゲルに接着できたと考えられた。

Integrin  $\beta 4$  は、前節のヘミデスモソーム結合の役割に加え、創傷治癒時には遊走を先導するラメリポディア形成を担うことも知られており [26]、細胞シート接着後の Integrin  $\beta 4$  が細胞間から細胞-コラーゲンゲル接着部位に移行したことは、細胞シートの接着性を高めるとともに、コラーゲンゲルを認識して細胞内に刺激を伝えたと考えられた (図 3-7)。

アクトミオシンは強固な細胞間接着や遊走に働くと共に [24, 25]、核の位置や形を制御することが知られている [27, 28]。剥離した後に接着させないで遊離の



状態を保った細胞シートは基底層のリン酸化ミオシンの発現が低下した。これは基底層細胞が足場を失った効果だと考えられた (図 3-13)。一方で、接着後の細胞シートの基底層にはリン酸化ミオシンが発現しており遊走能の増大に寄与したと考えられる。さらに、アクトミオシンが核の位置や形を制御した結果、接着後の細胞シートの基底層細胞の核の長軸の角度が平行に近づいていったと考えられた (図 3-10)。

#### 3.4.4 基底層における Partial EMT

EMT は、恒常的には静的で極性を持つ上皮細胞が、遊走や浸潤のような動的な挙動を持つ間葉系細胞の性質を獲得する時に起こる分子機構である[29, 30]。EMT は間葉系の性質を持った癌細胞で多く研究が進められており、TGF- $\beta$  経路、JAK-STAT 経路、PDGF 経路、Notch 経路、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路といった多くのシグナル伝達経路、パラクラインシグナル伝達が報告されている。これらいずれの場合も第一段階として細胞間接着が減少する[31, 32]。本研究における細胞シートの基底層では、コラーゲンゲルに接着後、間葉系マーカーの Vimentin が陽性となり、細胞間接着を担う E-cadherin や  $\beta$ -catenin が低下し (図 3-7)、EMT に基づいた遊走能獲得を示した (図 3-8)。その後、経時的な位相差顕微鏡観察と免疫染色により、遊走を先導する細胞では数種類の Integrin ならびに Type XVII collagen が陽性である一方で、上層のマーカーである K1 ならびに Filaggrin が陰性であるということから、EMT を起した基底層細胞がやはり遊走したことも明らかになった (図 3-9)。

EMT は、高い間葉系の性質を獲得するまでに多くの段階があることも報告されており、中間の段階は Partial EMT、Hybrid epithelial/mesenchymal、Intermediate EMT、などと呼称される[33]。接着後の細胞シート基底層で、E-cadherin との結合を失い、遊離した  $\beta$ -catenin は間葉系マーカーの転写因子として働き、高い間葉系の性質や浸潤能の獲得がなされるとの知見がある[16, 17]。Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の阻害剤である Imatinib、または促進剤である SB216763 を添加した実験を行ったが、どちらも遊走が阻害され、シグナル伝達経路の特定には至らなかった (図 3-24、図 3-25)。薬剤添加実験によるシグナル伝達経路の詳細な解析には、最適濃度やシグナル経路の上流と下流のそれぞれに特異的な阻害剤や促進剤などを行う余地があるとも考えられた。ただし、接着後の NHEK 細胞シートでは

$\beta$ -catenin の核内移行は観察されなかったことに加えて、定量 PCR の解析でも、接着の前後で間葉系マーカーの発現が増大することもないことから（図 3-23）、 $\beta$ -catenin が間葉系マーカーの転写因子として働いていない可能性が高く、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路で EMT が起こっている可能性は低いと見積もられた。E-cadherin との結合がなされていない  $\beta$ -catenin は分解されることも知られており[32]、本研究結果もこれに類似していると考えられる。したがって、接着後の NHEK 細胞シートの基底層では、遊走能は獲得したものの、高い間葉系は示さないという上皮細胞と間葉系細胞の中間的な性質である Partial EMT が起こったことを明らかにした（図 3-29）。

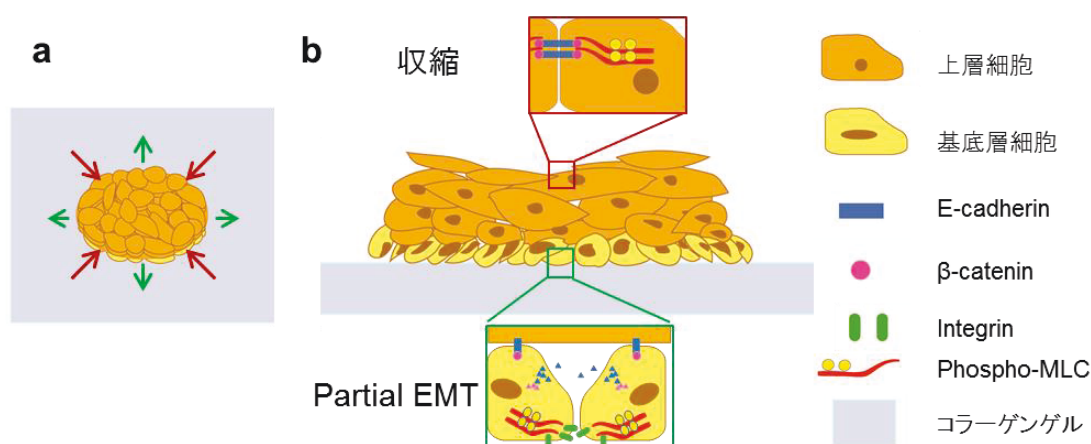


図 3-29. 重層扁平上皮細胞シート接着後の初期挙動の模式図。(a) 接着後の細胞シートは中心に向かう収縮と外側に伸展する遊走挙動が段階的に起こる。(b) 接着後の細胞シートの断面図と代表的なタンパク質発現パターン。上層は接着前の状態を維持し、基底層では E-cadherin と  $\beta$ -catenin が分解され、リン酸化ミオシンが発現するといった Partial EMT が起こる。これに伴い、細胞が伸展して核の角度が水平に近づく。【[1]より改変・転載】

低  $\text{Ca}^{2+}$  培地で培養した NHEK 細胞では、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性の細胞接着タンパク質である E-cadherin による細胞間接着の機能が低下し[34]、Vimentin の発現を始めとした間葉系様の性質を示す報告がある[5]。本実験では、細胞シートを作製する前の NHEK 細胞を低  $\text{Ca}^{2+}$  培地を用いて継代していたため、この時点で Vimentin が発現し、その後に細胞シート作製のために高  $\text{Ca}^{2+}$  培地である上皮分化培地に培養条件を変化させても、基底細胞で Vimentin が残存したと考えられる。細胞シートの Partial EMT がいつ、どの段階まで進化したかは議論の余地があるが、

Vimentin は EMT や細胞遊走を誘導する機能を持ったタンパク質でもあるため[35]、これが Partial EMT を誘導した可能性があると考えられた。

### 3.4.5 細胞シートの遊走挙動

重層扁平上皮組織の集団的な遊走挙動は、すでに接着された状態かつ、遊走方向が一方向に規定されたスクラッチアッセイなどで解析されてきた[36, 37]。これらの解析により、上層の細胞が基底層を追い越しながら遊走するリープフロッグ説[36]、発現ケラチンが変化しながら遊走する説[37]、基底層細胞が遊走する説[38, 39]といったいくつかの説が提案されてきた。本研究では、重層扁平上皮細胞シートをコラーゲンゲルのおよそ中心に接着させ、シート全周のいずれの方向へも遊走できる条件で解析を行った。これにより、内向きに収縮して細胞シートの強度を高めようとする上層の挙動や、この収縮があるにもかかわらず基底層細胞が様々な方向への遊走を先導して細胞シートを伸展させ、広範囲にわたる創傷被覆に有効な挙動を示すことを明らかにした。

Partial EMT の各段階の詳細な定義にはさらなる研究が必要であるとされているが、コラーゲンゲル内で上皮細胞は観察されず、本研究のモデル実験においては浸潤しないことがわかった。すなわち、創傷治癒に働く II 型 EMT に分類されると考えられる。上皮細胞シートが高い間葉系の性質である癌細胞のように浸潤能を獲得しないことは移植治療において重要である。

本実験では、上層は剥離したものの、3 週後でも細胞シートの基底層がコラーゲンゲルとの接着を維持していた (図 3-26)。よって、細胞外マトリックスと接着した基底層の上皮細胞は、細胞シート移植により食道上皮が再生に至るまでの約 3 週の間[40]、被覆し続けられるということが示唆された。さらに、熱傷に自家培養表皮移植する治療を施すと、12 年後でもその部位に培養経たことによって短くなったテロメアを持つ細胞が確認され、表皮細胞が残存したと考えられている[41]。よって移植した上皮細胞シートは数年にわたって接着を維持するとも期待される。

以上をまとめた、接着後の重層扁平上皮細胞シートの遊走を含む動的挙動の模式図を図 3-30 に示す。

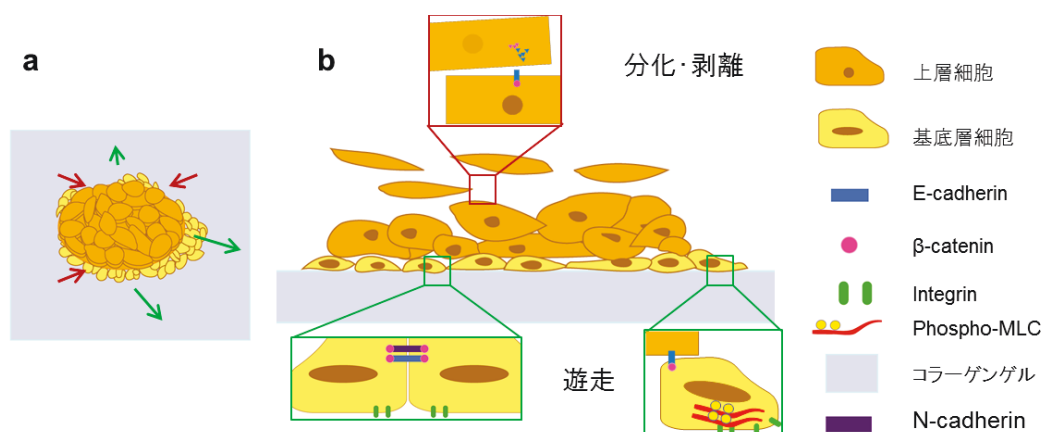


図 3-30. 重層扁平上皮細胞シート接着後の遊走挙動の模式図。(a) 接着後の細胞シートの収縮と遊走挙動。(b) 接着後の細胞シートの断面図と代表的なタンパク質発現パターン。【[1]より改変・転載】

コラーゲンゲル内に様々な細胞を包埋して共培養する実験を行った結果、細胞シートに悪影響を及ぼす様子は観察されず、線維芽細胞や筋芽細胞存在下などで細胞シートの伸展する様子が観察された。*In vivo* の創傷床に移植した際にもこれら細胞種が存在するため、はサイトカインを始めとした因子が細胞シートの伸展を促進して、被覆面積が高まり創傷治癒に有利に働く可能性があることを示した。

線維芽細胞は IL-6、IL-8、G-CSF といった多くのサイトカインを分泌して上皮細胞の遊走を助けることが報告されていることから[39, 42]、細胞シートの基底層が遊走能をより強く獲得し、上層の細胞を強く牽引した結果、上層の細胞の収縮が抑えられて広く伸展したと考えられる。あるいは、線維芽細胞が分泌するサイトカインの働きによって、上層でも EMT が起こり、上層の細胞も遊走に働く仮説も考えられた。これより、様々な細胞やサイトカインが存在する生体に上皮細胞シートを移植した場合、現在のゲル内の線維芽細胞の数が限られている実験系よりも細胞シートの被覆による創傷治癒効果が顕著に発揮されると期待される。実際に、移植後の口腔粘膜上皮細胞シートは高い透明性を示し[43]、食道癌切除後の術傷に移植して 1 週間後に内視鏡で観察すると、細胞シートは透明で存在が確認しづらいが移植された部位に膿が付きにくい傾向がみられている[7, 19]。線維芽細胞をゲルに包埋した本 *in vitro* モデルでも細胞シートは顕



著に伸展して上層が薄くなり、生体への移植結果と整合すると考えられた（図 3-17, 図 3-19）。

#### 3.4.6 第三章まとめ

- ①細胞シート接着後の動的な挙動を詳細に解析ができるコラーゲンゲルを用いた *in vitro* モデル実験系を確立した。
- ②重層扁平上皮細胞シートは接着後、基底層において上皮系と間葉系の間程度度の性質である Partial EMT を起こすことを明らかにした。
- ③経時的な位相差顕微鏡観察により、接着後の重層扁平上皮細胞シートでは収縮を伴いつつ Partial EMT を起こした基底層細胞が遊走することを示した。これより、細胞シートは接着後に遊走・伸展して創傷部位を被覆することで、治癒に寄与すると考えられた。
- ④NHDF を包埋したコラーゲンゲルに細胞シートを接着させると、細胞シートの伸展度合が約 2 倍に増大した。これより、創傷部位を被覆して治癒に寄与する細胞シートの効果は線維芽細胞などが存在する実際の創傷床においてさらに高まることが強く示唆された。

### 第三章 参考文献

1. Kasai, Y, Takeda, N, Kobayashi, S, Takagi, R and Yamato, M (2017) Cellular events and behaviors after grafting of stratified squamous epithelial cell sheet onto a hydrated collagen gel, *FEBS Open Bio*, DOI: 10.1002/2211-5463.12213.
2. Schober, M, Raghavan, S, Nikolova, M, Polak, L, Pasolli, HA, Beggs, HE, Reichardt, LF and Fuchs, E (2007) Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics, *J Cell Biol* **176**, 667-80.
3. Tomar, A, Schlaepfer, DD (2009) Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility, *Curr Opin Cell Biol* **21**, 676-83.
4. Vespa, A, Darmon, AJ, Turner, CE, D'Souza, SJ and Dagnino, L (2003) Ca<sup>2+</sup>-dependent localization of integrin-linked kinase to cell junctions in differentiating keratinocytes, *J Biol Chem* **278**, 11528-35.
5. Takagi, R, Yamato, M, Murakami, D, Sugiyama, H and Okano, T (2011) Low calcium culture condition induces mesenchymal cell-like phenotype in normal human epidermal keratinocytes, *Biochem Biophys Res Commun* **412**, 226-31.
6. Xu, K-P, Ding, Y, Ling, J, Dong, Z and Yu, F-SX (2004) Wound-induced HB-EGF ectodomain shedding and EGFR activation in corneal epithelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 813-20.
7. Kanai, N, Yamato, M, Ohki, T, Yamamoto, M and Okano, T (2012) Fabricated autologous epidermal cell sheets for the prevention of esophageal stricture after circumferential ESD in a porcine model, *Gastrointest Endosc* **76**, 873-81.
8. Kondo, M, Yamato, M, Takagi, R, Namiki, H and Okano, T (2013) The regulation of epithelial cell proliferation and growth by IL-1 receptor antagonist, *Biomaterials* **34**, 121-9.
9. Tsunenaga, M, Kohno, Y, Horii, I, Yasumoto, S, Huh, NH, Tachikawa, T, Yoshiki, S and Kuroki, T (1994) Growth and differentiation properties of normal and transformed human keratinocytes in organotypic culture, *Jpn J Cancer Res* **85**, 238-44.

10. Zhou, L, An, N, Haydon, RC, Zhou, Q, Cheng, H, Peng, Y, Jiang, W, Luu, HH, Vanichakarn, P, Szatkowski, JP, Park, JY, Breyer, B and He, T-C (2003) Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the  $\beta$ -catenin signaling activity, *Cancer Letters* **193**, 161-70.
11. Coghlan, MP, Culbert, AA, Cross, DAE, Corcoran, SL, Yates, JW, Pearce, NJ, Rausch, OL, Murphy, GJ, Carter, PS, Cox, LR, Mills, D, Brown, MJ, Haigh, D, Ward, RW, Smith, DG, Murray, KJ, Reith, AD and Holder, JC (2000) Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription, *Chem Biol* **7**, 793-803.
12. Joensuu, H, Roberts, PJ, Sarlomo-Rikala, M, Andersson, LC, Tervahartiala, P, Tuveson, D, Silberman, S, Capdeville, R, Dimitrijevic, S, Druker, B and Demetri, GD (2001) Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor, *N Engl J Med* **344**, 1052-6.
13. Sawyer, JS, Anderson, BD, Beight, DW, Campbell, RM, Jones, ML, Herron, DK, Lampe, JW, McCowan, JR, McMillen, WT, Mort, N, Parsons, S, Smith, EC, Vieth, M, Weir, LC, Yan, L, Zhang, F and Yingling, JM (2003) Synthesis and activity of new aryl- and heteroaryl-substituted pyrazole inhibitors of the transforming growth factor-beta type I receptor kinase domain, *J Med Chem* **46**, 3953-6.
14. Varghese, F, Bukhari, AB, Malhotra, R and De, A (2014) IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples, *PLoS One* **9**, e96801.
15. Di Lullo, GA, Sweeney, SM, Korkko, J, Ala-Kokko, L and San Antonio, JD (2002) Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen, *J Biol Chem* **277**, 4223-31.
16. Daniels, DL, Spink, KE and Weis, WI (2001) Beta-catenin: molecular plasticity and drug design, *Trends Biochem Sci* **26**, 672-8.
17. Janssens, N, Janicot, M and Perera, T (2006) The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery, *Invest New Drugs* **24**, 263-80.
18. Roura, S, Miravet, S, Piedra, J, Garcia de Herreros, A and Dunach, M (1999) Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation, *J Biol Chem* **274**, 36734-40.

19. Ohki, T, Yamato, M, Ota, M, Takagi, R, Murakami, D, Kondo, M, Sasaki, R, Namiki, H, Okano, T and Yamamoto, M (2012) Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets, *Gastroenterology* **143**, 582-8 e1-2.
20. Kariya, Y, Sato, H, Katou, N, Kariya, Y and Miyazaki, K (2012) Polymerized laminin-332 matrix supports rapid and tight adhesion of keratinocytes, suppressing cell migration, *PLoS One* **7**, e35546.
21. Marinkovich, MP, Lunstrum, GP and Burgeson, RE (1992) The anchoring filament protein kalinin is synthesized and secreted as a high molecular weight precursor, *J Biol Chem* **267**, 17900-6.
22. Litjens, SH, de Pereda, JM and Sonnenberg, A (2006) Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes, *Trends Cell Biol* **16**, 376-83.
23. Rabinovitz, I, Toker, A and Mercurio, AM (1999) Protein kinase C-dependent mobilization of the alpha6beta4 integrin from hemidesmosomes and its association with actin-rich cell protrusions drive the chemotactic migration of carcinoma cells, *J Cell Biol* **146**, 1147-60.
24. Vicente-Manzanares, M, Ma, X, Adelstein, RS and Horwitz, AR (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration, *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 778-90.
25. Vicente-Manzanares, M, Zareno, J, Whitmore, L, Choi, CK and Horwitz, AF (2007) Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells, *J Cell Biol* **176**, 573-80.
26. Underwood, RA, Carter, WG, Usui, ML and Olerud, JE (2009) Ultrastructural localization of integrin subunits beta4 and alpha3 within the migrating epithelial tongue of in vivo human wounds, *J Histochem Cytochem* **57**, 123-42.
27. Lo, CM, Buxton, DB, Chua, GC, Dembo, M, Adelstein, RS and Wang, YL (2004) Nonmuscle myosin IIB is involved in the guidance of fibroblast migration, *Mol Biol Cell* **15**, 982-9.

28. Ivanov, AI, Bachar, M, Babbin, BA, Adelstein, RS, Nusrat, A and Parkos, CA (2007) A unique role for nonmuscle myosin heavy chain IIA in regulation of epithelial apical junctions, *PLoS One* **2**, e658.
29. Kalluri, R, Weinberg, RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J Clin Invest* **119**, 1420-8.
30. Savagner, P (2010) The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon, *Ann Oncol* **21 Suppl 7**, vii89-92.
31. Cano, A, Perez-Moreno, MA, Rodrigo, I, Locascio, A, Blanco, MJ, del Barrio, MG, Portillo, F and Nieto, MA (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, *Nat Cell Biol* **2**, 76-83.
32. Lamouille, S, Xu, J and Derynck, R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 178-96.
33. Grigore, AD, Jolly, MK, Jia, D, Farach-Carson, MC and Levine, H (2016) Tumor budding: The name is EMT. Partial EMT, *J Clin Med* **5**, 51-+.
34. Takeichi, M (1977) Functional correlation between cell adhesive properties and some cell-surface proteins, *J Cell Biol* **75**, 464-74.
35. Mendez, MG, Kojima, S and Goldman, RD (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition, *FASEB J* **24**, 1838-51.
36. Krawczyk, WS (1971) A pattern of epidermal cell migration during wound healing, *J Cell Biol* **49**, 247-63.
37. Paladini, RD, Takahashi, K, Bravo, NS and Coulombe, PA (1996) Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16, *J Cell Biol* **132**, 381-97.
38. Radice, GP (1980) The spreading of epithelial cells during wound closure in *Xenopus* larvae, *Dev Biol* **76**, 26-46.

39. Safferling, K, Sutterlin, T, Westphal, K, Ernst, C, Breuhahn, K, James, M, Jager, D, Halama, N and Grabe, N (2013) Wound healing revised: a novel reepithelialization mechanism revealed by in vitro and in silico models, *J Cell Biol* **203**, 691-709.
40. Kobayashi, S, Kanai, N, Ohki, T, Takagi, R, Yamaguchi, N, Isomoto, H, Kasai, Y, Hosoi, T, Nakao, K, Eguchi, S, Yamamoto, M, Yamato, M and Okano, T (2014) Prevention of esophageal strictures after endoscopic submucosal dissection, *World J Gastroenterol* **20**, 15098-109.
41. Counter, CM, Press, W and Compton, CC (2003) Telomere shortening in cultured autografts of patients with burns, *The Lancet* **361**, 1345-6.
42. Werner, S, Grose, R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines, *Physiol Rev* **83**, 835-70.
43. Nishida, K, Yamato, M, Hayashida, Y, Watanabe, K, Yamamoto, K, Adachi, E, Nagai, S, Kikuchi, A, Maeda, N, Watanabe, H, Okano, T and Tano, Y (2004) Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium, *N Engl J Med* **351**, 1187-96.

## **第四章 本研究の総括および今後の課題**

### **4.1 第一章の総括**

第一章には、本研究を遂行するにあたり必要な、上皮組織の知見や細胞シートを用いた食道再生医療の概要について記載した。また、細胞シートを用いた食道再生医療を優れた治療法として確立するためには、臨床研究によるデータの蓄積に加えて、基礎研究により細胞シートの安全性と有効性の根拠を示すことが重要であることを指摘した。これらを踏まえて、本研究における細胞シート作製のための細胞ソースとなる組織の低侵襲的な診断（第二章）ならびに細胞シート接着後の挙動解析（第三章）の研究の目的と意義を説明した。

### **4.2 第二章の総括および今後の課題**

#### **4.2.1 第二章の総括**

第二章では細胞シート治療の安全性向上を目指し、細胞シートを作製するための細胞試料の性状判別（言わば品質管理）を簡便に行う手法を開発した。具体的には低侵襲的に粘膜上皮細胞を採取するブラシバイオプシーとタンパク質発現解析であるウエスタンブロッティングを組み合わせ、ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングを考案し、低侵襲的に口腔粘膜上皮組織の上層のタンパク質発現解析ができる手法として確立した。さらに、ブラシバイオプシーで正常組織から採取した上皮細胞試料は、培養上皮癌細胞との比較で異なるタンパク質発現パターンを呈することも示した。これより本手法は上皮組織の上層までケラチンの発現パターンが変化する前癌病変の白板症や扁平苔癬といった口腔粘膜病変を、低侵襲的に診断するために有効であることが示唆された。



#### 4.2.2 今後の課題①：マーカータンパク質のさらなる検討

本研究では、分解されにくく死細胞でも残存しやすいタンパク質であるケラチンを分析対象とした。基底層のマーカーとして、核内転写因子タンパク質である p63 も用いて解析を行い、p63 が検出されないことから基底層細胞が採取されなかったと結論づけた。一方で、p63 は分化に伴って発現が低下することが知られており[1]、採取した細胞がすでに分化したことにより p63 が陰性であると考えられた。また、歯ブラシで擦過したことによるネクロシスの可能性も排除できない。したがって、他の核内タンパク質をはじめとするケラチン以外のタンパク質の発現解析を行うことや、アポトーシスマーカーの検出などを行うことによって、採取した細胞の種類や状態をより詳細にかつ網羅的に解析することが重要である。

#### 4.2.3 今後の課題②：口腔病変患者の組織を用いた臨床研究

本研究では、正常ドナーの組織を用いてブラシバイオプシーウエスタンブロッティングの手法を確立した。一方で、ブラシバイオプシーウエスタンブロッティングを病変診断法として確立するためには、様々な口腔病変患者の組織を用いた研究が重要である。このためには、倫理委員会への申請などを踏まえた上での臨床研究の実施が必要である。

### 4.3 第三章の総括および今後の課題

#### 4.3.1 第三章の総括

第三章では細胞シート移植による治療効果を分子生物学的手法に基づくデータで明らかにすることを目的とし、I 型コラーゲンをういたシンプルな *in vitro* モデル系を用いて細胞シート接着後の挙動を解析した。その結果、重層扁平上皮細胞シートは基底層で Partial EMT を起こしてコラーゲン上を遊走することを明らかにした。また、実際の創傷床と同様に、ゲルに線維芽細胞が加

わることによって上皮細胞シートの遊走と伸展が亢進して、創傷床の被覆能が増大することも明らかにした。

#### 4.3.2 今後の課題①：本 *in vitro* モデルの細胞シート品質評価への応用

現在の細胞シートの品質評価は、細胞がシート状に剥離できるかどうかの剥離試験、生細胞率のカウント、フローサイトメーターを用いたケラチンの陽性率の評価による上皮細胞の純度の算出など、細胞シート移植の安全性を保証する試験に留まっている[2]。本 *in vitro* モデルは、わずか1時間で細胞シートがシェーカー振盪に耐えうる接着を確認することができ、簡便に移植能を評価する品質管理試験として応用が出来る。第二章で確立した簡便な口腔粘膜上皮の解析に加えて、本 *in vitro* モデルによって、より確実な治療法確立に繋がり得ると考えられる。

さらに、細胞シート移植における接着の成功が100%でないという問題点を解決するために、細胞シートの接着性の向上は大変重要である。単一細胞レベルで知見があるマンガンイオンによるインテグリン活性化に加え[3]、細胞シート接着に重要な接着タンパク質の発現増大などを目指した各種実験にも、本研究の *in vitro* モデルは、接着性を評価する実験系に応用できると期待される。また、コラーゲンゲルに様々な細胞やサイトカインを添加し、より生体に近い条件において創傷治癒効果などについて詳細に解析することで、細胞シートの移植効果の分子機構のより深い理解につながると期待できる。

#### 4.3.3 今後の課題②：細胞シートの Partial EMT 機構の詳細な解析

重層扁平上皮細胞シートは基底層で創傷治癒に有効な Partial EMT が起こることを明らかにしたが、EMT がいつどのように誘導されたかは、定量 PCR や阻害剤添加実験によっても全貌は明らかにならなかった。本研究では細胞シートの全層から RNA を抽出して定量 PCR を行った。しかし、EMT が起こっていたのはほぼ基底層に特異的であったため、マイクロダイセクションや、インテグリン陽性細胞をセルソーターで分離するなど、細胞シートを層毎に区切り、EMT 関連の遺伝子発現などの解析を行うことも有効だと考えられる。

また、免疫染色の結果からこの EMT に伴って Integrin  $\beta 4$  が細胞間から細胞-コラーゲンゲル間に移動したと論じたが、この説を強化するためには透過型電子顕微鏡を用いた免疫電顕観察が有効だと考える。

#### 4.3.4 今後の課題③：細胞シートの集団的遊走機構の更なる解析

上皮細胞の集団的遊走 (Collective migration) は、単層上皮の遊走挙動ですら詳細な挙動や機構が解明されていない[4]。本研究ではさらに複雑な重層扁平上皮細胞シートの集団的遊走を解析し、基底層細胞に発現する数種の Integrin や Type XVII collagen が基底上層にも観察されることを見出した (図 3-2)。すなわち、細胞シート収縮時に細胞の基底層から基底上層に細胞が移動するとの挙動を強く示唆する新たな知見を得た (図 4-1)。

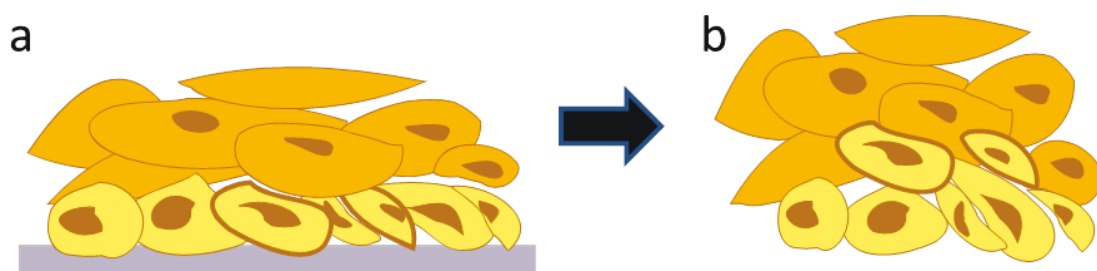


図 4-1. 細胞シート剥離時の基底層細胞の挙動仮説。黄色：基底層細胞、橙色：基底上層および上層細胞。青灰色：温度応答性インサート。(a) 温度応答性インサートから剥離前の重層扁平上皮細胞シート。(b) 細胞シート剥離後の収縮挙動に伴い、基底上層に持ち上げられる基底層細胞（太枠線）があるとの仮説。

また、コラーゲンゲル上で細胞シートを培養すると、基底上層細胞は分化して上層の細胞を形成した。しかし、コラーゲンゲルに NHDF を包埋すると細胞シートが薄く伸展した。これは、基底層細胞が早い段階で遊走し、空いた隙間に基底上層細胞が降りてさらに遊走した結果によるとも考えられた (図 4-2)。

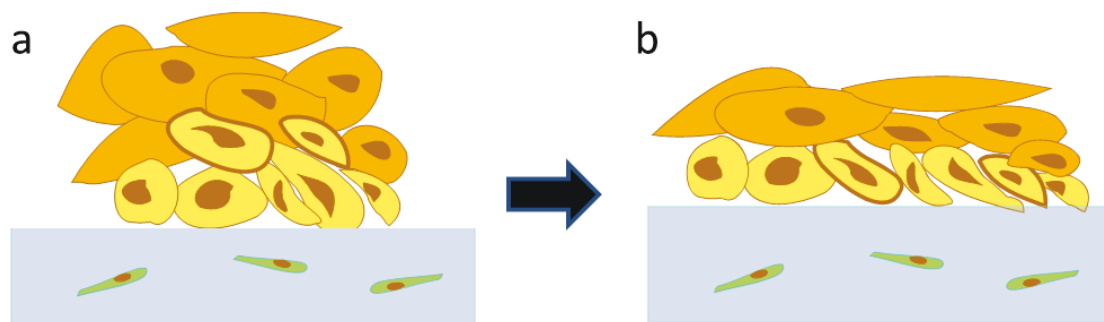


図 4-2. 細胞シート移植後の基底上層細胞の挙動仮説。黄色：基底層細胞、橙色：基底上層および上層細胞。水色：コラーゲンゲル、緑色：NHDF。(a) コラーゲンゲルに接着した重層扁平上皮細胞シート。(b) NHDF 存在下で、細胞シート接着後の基底細胞の遊走に伴い、基底上層にの細胞が基底層に降りてきて細胞が遊走する挙動仮説。

これより、上層の細胞は、収縮挙動によって基底細胞の遊走の妨げになるとの仮説と、遊走の細胞ソースになり得るという 2 つの仮説が考えられた。基底層細胞が一度基底上層に位置し、再度基底層に降りて遊走する説は前例がなく、収縮を伴う重層扁平上皮細胞シートでなければ解析し得ない挙動と考えられる。また、上層の細胞の重要性の理解は、培養で徐々に重層化が進む上皮細胞シートをどの重層段階で移植するのが効果的であるかを決定する上で重要であり、この研究は生物学的にも臨床応用にも価値があると考えられる。

この上層と基底層が行き来する挙動を解析するためには、基底層ならびに上層を特異的に標識してイメージング解析を行うことが有効と考える。例えばブロモデオキシウリジンをインサートメンブレン下から送り込む手法や、Integrin や Type XVII collagen などを緑色蛍光タンパク質で標識する方法などが考えられる。このためには、厚みのある細胞シートの内部をリアルタイムで観察する技術の確立も必要である。

#### 4.3.5 今後の課題④：共培養系の詳細な解析

ゲル培養場に線維芽細胞を包埋して共培養した実験において細胞シートが伸展した結果から、上皮細胞シートは線維芽細胞との接触もしくは、線維芽細胞が分泌した液性因子やエクソソームを介して影響を受けたと考察される。今後、細胞シート接着後の培養上清に存在する液性因子を酵素結合免疫吸着検定法などにより分析し、線維芽細胞の影響について機構を解明することができれば、

上皮細胞シート移植による治療効果の増大につながると期待できる。さらに、上皮細胞シートについても同様に解析し、本研究で示した創傷床の再上皮化のための移植片としての働きだけでなく、サイトカインを放出して周囲の上皮細胞を活性化させ、過剰な炎症を抑制する効果などを調べることで、上皮細胞シート移植の治療効果の全貌に迫ることができると考えられる。

#### **4.4 おわりに**

iPS 細胞の樹立などによって、培養細胞の移植による再生医療は、今後急速に医療の歴史を塗り替えていくことが期待されている。この再生医療研究は、幹細胞研究や組織工学研究の進歩や、生体組織ならびに疾患の分子生物学的に理解されてきたことも相まって、臨床における治療への応用も進んでいる。本博士研究では、培養細胞治療の最先端で用いられている上皮細胞シートを対象として、重層扁平上皮細胞シートの移植後の分子機構の一部を明らかにし、さらに、安全かつ低侵襲的な細胞ソースの品質の解析法の開発も行った。本研究は今後、ますます重要になると考えられる培養細胞群の移植治療における基礎をなす研究でもあり、多くの患者救済を目的とした研究に寄与すると期待している。

## **第四章 参考文献**

1. Koster, MI, Roop, DR (2004) The role of p63 in development and differentiation of the epidermis, *J Dermatol Sci* **34**, 3-9.
2. Takagi, R, Yamato, M, Murakami, D, Kondo, M, Ohki, T, Sasaki, R, Nishida, K, Namiki, H, Yamamoto, M and Okano, T (2011) Fabrication and validation of autologous human oral mucosal epithelial cell sheets to prevent stenosis after esophageal endoscopic submucosal dissection, *Pathobiology* **78**, 311-9.
3. Xiong, JP, Stehle, T, Zhang, R, Joachimiak, A, Frech, M, Goodman, SL and Arnaout, MA (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand, *Science* **296**, 151-5.
4. Sadati, M, Taheri Qazvini, N, Krishnan, R, Park, CY and Fredberg, JJ (2013) Collective migration and cell jamming, *Differentiation* **86**, 121-5.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、教育学部出身である私を快く入室をさせて下さり、本博士研究を進めるにあたり、日々時間を惜しまず多岐に渡り指導をしていただき、主査を務めて下さった早稲田大学理工学術院の武田直也准教授に深く感謝致します。各研究に対する良い点および不足な点への観察眼、結果の論じ方、考察の重要性、研究体制など、研究者の基礎をなすにあたって重要なことをこの博士課程で学ぶことができたことは、苦勞して早稲田大学先進理工学研究科武田研究室で博士を取得する価値があったと思っております。

東京女子医科大学先端生命研究所に研究生として所属することを認めて下さり、修士課程から6年間にわたり私に研究を教えて下さった大和雅之教授に深く御礼申し上げます。大和先生のおかげで再生医療に興味を持つことができ、臨床研究への従事も含め、他の研究室ではできないような貴重な経験をすることができました。今後もこの経験を生かして頑張ると共に、大和先生のような豊富な知識を身に付けたいと思っております。

学部時代から修士課程まで指導して下さい、東京女子医科大学先端生命研究所との共同研究を開始するきっかけを作して下さい、さらに本博士研究の副査を務めて下さった、早稲田大学教育学部の並木秀男名誉教授に感謝致します。研究の良さを常と感じ取れることや、研究仲間との交流など、研究を行う上で重要なことが多く感じておりました。

本博士研究の副査ならびに、東京女子医科大学先端生命研究所で快く研究を認めて下さった、清水達也教授に感謝致します。学生である私に親切な目線で話すことや、ルールを作る、守るということは今後指導者として活躍する上で重要だと思いました。

本博士研究の副査を務めて下さった、早稲田大学理工学術院の仙波憲太郎教授に感謝致します。この博士論文を完成させる上でのアドバイスは大変参考になりました。早稲田大学の生命医科で博士取得した自信をもって今後も研究を行いたいと思います。

東京女子医科大学先端生命研究所で研究を進める上でのモチベーションを育てて下さった、岡野光夫特任教授、金井信雄特任講師に深く御礼申し上げます。



す。研究は一人でやることも大事ですが、研究仲間と過ごす時間も非常に重要であることを、臨床研究を通じて学べたことは自分の成長に繋がりました。

東京女子医科大学先端生命研究所で研究の指導に加えて、臨床研究では常に私を支えて下さった、高木亮さんに深く感謝致します。

修士課程より東京女子医科大学先端生命研究所との共同研究を開始するきっかけを作って下さった、近藤誠さん、近藤統子さんに御礼申し上げます。

慣れない臨床現場でしたが、私を支え、共同臨床研究をして下さった、長崎大学医学部消化器外科ならびに消化器内科、口腔外科、細胞療法部の皆様に御礼申し上げます。

研究生活を共にし、本研究を進める上でのモチベーションを支えて下さった、武田研究室の皆様、東京女子医科大学先端生命医科学研究所の皆様、大和先生グループの皆様、志村大輔さん、Dr. Sebastian Sjöqvist に感謝致します。

共同研究をしていただいたと共に、次の就職先に推薦して下さいました森野常太郎先生に御礼を申し上げるとともに、今後ともお世話になりたいと思います。

最後に、常に私を支えて下さった両親、祖母に深く感謝しております。今後とも謙虚な姿勢を持って頑張っていきたいと思います。

本研究を遂行するにあたり、卓越した大学院拠点（実践的化学知）リサーチ・アシスタント及び、柳原操再生医療研究支援寄附金の助成をいただきました。

平成 29 年 3 月

葛西 善行

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 葛西 善行 印

(2017 年 3 月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
【論文】○	・ <u>Yoshiyuki Kasai</u> , Naoya Takeda, Ryo Takagi, Shinichiro Kobayashi, Masayuki Yamato. “Cellular events and behaviors after grafting of stratified squamous epithelial cell sheet onto a hydrated collagen gel”, <i>FEBS Open Bio</i> , 2017, DOI: 10.1002/2211-5463.12213.
【論文】○	・ <u>Yoshiyuki Kasai</u> , Hiroaki Sugiyama, Ryo Takagi, Makoto Kondo, Toshiyuki Owaki, Hideo Namiki, Teruo Okano, Naoya Takeda, Masayuki Yamato. “Brush biopsy of human oral mucosal epithelial cells as a quality control of the cell source for fabrication of transplantable epithelial cell sheets for regenerative medicine”, <i>Regen Ther</i> , 2016, 4: 71-7.
【論文】	・Ryo Takagi, Shinichiro Kobayashi, Masayuki Yamato, Toshiyuki Owaki, <u>Yoshiyuki Kasai</u> , Takahiro Hosoi, Yusuke Sakai, Kengo Kanetaka, Tokutaro Minamizato, Asuka Minematsu, Makoto Kondo, Nobuo Kanai, Naoyuki Yamaguchi, Kazuhiro Nagai, Yasushi Miyazaki, Naoya Takeda, Fumio Fukai, Izumi Asahina, Taiga Miyazaki, Shigeru Kohno, Masakazu Yamamoto, Kazuhiko Nakao, Susumu Eguchi, Teruo Okano. “How to prevent the contamination with <i>Candida albicans</i> during the fabrication of transplantable oral mucosal epithelial cell sheets”, <i>Regen Ther</i> , 2015, 1: 1-4.
【論文】	・Shinichiro Kobayashi, Nobuo Kanai, Takeshi Ohki, Ryo Takagi, Naoyuki Yamaguchi, Hajime Isomoto, <u>Yoshiyuki Kasai</u> , Takahiro Hosoi, Kazuhiko Nakao, Susumu Eguchi, Masakazu Yamamoto, Masayuki Yamato, Teruo Okano. “Prevention of esophageal strictures after endoscopic submucosal dissection”, <i>World J Gastroenterol</i> , 2014, 20: 15098-109.
【講演】	・○ <u>葛西 善行</u> , 武田 直也, 高木 亮, 大和 雅之. “コラーゲングル接着による重層扁平上皮細胞シートの EMT 挙動解析”, 第 16 回 再生医療学会総会, O-25-3, 宮城. 2017 年 3 月. (口頭発表)
【講演】	・○ <u>Yoshiyuki Kasai</u> , Ryo Takagi, Shinichiro Kobayashi, Teruo Okano, Naoya Takeda, Masayuki Yamato. “ <i>In vitro</i> studies on the mechanistic details of adhesion and wound healing of epithelial cell sheet therapy”, JSPS A3 foresight international symposium on nano-biomaterials and regenerative medicine, Tokyo, Japan. March, 2016. (Oral)
【講演】	・○ <u>Yoshiyuki Kasai</u> , Ryo Takagi, Shinichiro Kobayashi, Teruo Okano, Naoya Takeda, Masayuki Yamato. “ <i>In vitro</i> studies on the mechanistic details of adhesion and wound healing of epithelial cell sheet therapy”, JSPS A3 foresight international symposium on nano-biomaterials and regenerative medicine, Tokyo, Japan. August, 2015. (Oral)

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
【講演】	・○ <u>葛西 善行</u> , 大和 雅之, 高木 亮, 小林 慎一郎, 杉山 洋章, 江口 晋, 武田 直也, 岡野 光夫. “上皮細胞シートの ESD 創面への生着と創傷治癒機構の <i>ex vivo</i> モデルによる解析”, 第 14 回 日本再生医療学会総会, O-12-3, 神奈川. 2015 年 3 月. (口頭発表)
【講演】	・小林 慎一郎, 金井 信雄, 細井 孝洋, <u>葛西 善行</u> , 高木 亮, 大和 雅之, 江口 晋. “再生医療本格化に向けた食道領域における組織工学的治療戦略と前臨床研究での検討”, 第 14 回 日本再生医療学会総会, O-40-2, 神奈川. 2015 年 3 月.
【講演】	・○ <u>葛西 善行</u> , 大和 雅之, 高木 亮, 小林 慎一郎, 武田 直也, 岡野 光夫. “ <i>Ex vivo</i> studies on the mechanistic details of adhesion and wound healing of epithelial cell sheet therapy”, 私立大学戦略的基盤形成支援事業ストレス応答制御に基づく次世代型健康寿命科学の研究拠点形成 第 3 回 成果報告会, 東京. 2015 年 3 月. (ポスター発表)
【講演】	・○ <u>Yoshiyuki Kasai</u> , Ryo Takagi, Shinichiro Kobayashi, Susumu Eguchi, Teruo Okano, Naoya Takeda, Masayuki Yamato. “ <i>Ex vivo</i> studies on the mechanistic details of adhesion and wound healing of epithelial cell sheet”, The 16th joint symposium between the University of Bonn and Waseda University, Tokyo Japan. February, 2015. (Poster)
【講演】	・○ <u>Yoshiyuki Kasai</u> , Masayuki Yamato, Ryo Takagi, Shinichiro Kobayashi, Naoya Takeda, Teruo Okano. “ <i>In vitro</i> studies on the mechanistic details of adhesion and wound healing of epithelial cell sheet therapy”, JSPS A3 Foresight international symposium on nano-biomaterials and regenerative medicine, Tokyo, Japan. October, 2014. (Poster)
【講演】	・○ <u>Yoshiyuki Kasai</u> , Masayuki Yamato, Hiroaki Sugiyama, Ryo Takagi, Makoto Kondo, Shinichiro Kobayashi, Naoya Takeda, Teruo Okano. “The molecular mechanism of cell sheet adhesion”, International symposium on integration of chemistry and bioscience, P34, Tokyo, Japan. January, 2014. (Poster)
【講演】	・○ <u>葛西 善行</u> , 大和 雅之, 杉山 洋章, 高木 亮, 近藤 誠, 並木 秀男, 武田 直也, 岡野 光夫. “ブラシバイ オプシー法を用いたヒト口腔上皮組織におけるケラチンの網羅的発現解析”, 第 36 回 日本分子生物学会年会, #1012, 神戸, 2013 年 12 月. (ポスター発表)
【講演】	・○ <u>Yoshiyuki Kasai</u> , Masayuki Yamato, Hiroaki Sugiyama, Ryo Takagi, Makoto Kondo, Hideo Namiki, Naoya Takeda, Teruo Okano. “Western blot analysis of keratin expressions in human oral mucosal epithelial cells collected by brush biopsy”, TERMIS-AP 2013, #111, Shanghai and Wuzhen, China. October, 2013. (Poster)

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
【講演】	・大脇 敏之, 高木 亮, 近藤 誠, <u>葛西 善行</u> , 細井 孝洋, 堺 裕輔, 江口 晋, 大和 雅之, 岡野 光夫. “輸送後の細胞シートの品質安定性”, 第12回 再生医療学会, 神奈川, 2013年3月.
【講演】	・○ <u>葛西 善行</u> , 杉山 洋章, 高木 亮, 近藤 誠, 大和 雅之, 並木 秀男, 岡野 光夫. “類粘膜上皮細胞シートの品質管理を目的とした抗体AE5の解析”, 第22回 バイオマテリアル若手研究会, A16, 東京, 2011年11月. (ポスター発表)
【その他】	・○ <u>葛西 善行</u> . “大学院生としての再生医療研究への取り組み”, 未来医学 特集 III 未来医学研究会のいま, No. 29, 2016年3月.
【その他】	・○ <u>葛西 善行</u> . “市民講座 聴講報告”, 未来医学 特集 III 未来医学研究会の活動, No. 28, 2015年3月.
	以下余白